

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Zellbiologie
(Tumorforschung)

**Die Funktion des gewebespezifischen Transkriptionsfaktors HNF1 β in
der Nierenentwicklung von *Xenopus laevis***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften in der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Wiltrud Wild, geb. Geigele

aus Heitersheim im Breisgau

2011

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting

1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. G.U. Ryffel

2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. K. Zerres, Aachen

Tag der mündlichen Prüfung: 3. November 2011

Teile der vorliegenden Arbeit sind in folgender Publikation eingegangen:

Wild, W., Pogge von Strandmann, E., Nastos, A., Senkel, S., Lingott-Frieg, A., Bulmann, M., Bingham, C., Ellard, S., Hattersley, A.T., Ryffel, G.U. (2000): The mutated human gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 β inhibits kidney formation in developing *Xenopus* embryos. PNAS 97 (9), 4695-4700.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1	Die gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren HNF1 α und HNF1 β	7
1.2	HNF1-Genmutationen beim Menschen.....	8
1.3	<i>Xenopus laevis</i> als Modellorganismus	11
1.4	Der Pronephros aus <i>Xenopus</i> als Modellsystem für das Studium der Nephrogenese	12
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	15
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Chemikalien, Puffer und Enzyme	16
2.2	Standardmethoden.....	16
2.3	Plasmidkonstrukte	16
2.3.1	Expressionskonstrukte.....	16
2.3.2	Luciferasereporterkonstrukte.....	17
2.4	In-vitro-Translation von Proteinen.....	17
2.5	Gelretardationsanalyse	18
2.6	Kultur von HeLa-Zellen	18
2.7	Transiente Transfektion von HeLa-Zellen	19
2.8	Bestimmung der Luciferaseaktivität	19
2.9	Statistische Auswertung der Transfektionsdaten	19
2.10	Indirekte Immunfluoreszenz von HeLa-Zellen	20
2.11	Western-Blot-Analyse.....	20
2.12	Haltung von <i>Xenopus laevis</i>	21

2.13	Gewinnung von <i>Xenopus</i> -Embryonen.....	21
2.14	In-vitro-Transkription von RNA	22
2.15	Mikroinjektion von RNA in <i>Xenopus</i> -Embryonen	22
2.16	Fixierung von <i>Xenopus</i> -Embryonen.....	22
2.17	Aufreinigung von RNA aus <i>Xenopus</i> -Embryonen	23
2.18	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	23
2.19	Proteinextrakte aus <i>Xenopus</i> -Embryonen	24
2.20	Immunfluoreszenzanalyse des Pronephros	24
2.21	Whole-mount-in-situ-Hybridisierung.....	25
2.22	Analyse und fotografische Dokumentation von <i>Xenopus</i> -Embryonen	25
3	ERGEBNISSE.....	26
3.1	Charakterisierung der HNF1 β -Mutante P328L329fsdelCCTCT	26
3.1.1	Auswirkung auf die Proteinsequenz.....	26
3.1.2	In-vitro-Expression der HNF1 β -Mutante.....	27
3.1.3	DNA-Bindung und Dimerisierung der HNF1 β -Mutante	27
3.1.4	Transaktivierungspotential der HNF1 β -Mutante	28
3.1.5	Intrazelluläre Lokalisation.....	30
3.1.6	Einfluss der HNF1 β -Mutante auf die Wildtypaktivität.....	31
3.2	Überexpression von HNF1 β , P328L329 und HNF1 α im <i>Xenopus</i> -Embryo	32
3.2.1	Aktivierung der endogenen HNF1 α -Gentranskription	32
3.2.2	Auswirkung auf die Entwicklung des Pronephros	34
3.2.2.1	In-vivo-Beobachtung der Pronephros-Entwicklung.....	34
3.2.2.2	Immunfluoreszenz-Analyse des Pronephros in den Stadien 45 bis 48.....	36
3.2.2.3	Immunfluoreszenz-Analyse des Pronephros in den Stadien 35/36 bis 39.....	37
3.2.2.4	Einfluss auf die Gentranskription von Xlim-1	38
3.2.3	Auswirkung auf die Pigmentierung und Entwicklung des Kopfes.....	39
3.2.3.1	Veränderungen des Pigmentierungsmusters	39

3.2.3.2	Fehlbildungen des Kopfes	40
4	DISKUSSION	43
4.1	Unterschiede im Transaktivierungspotential von P328L329 und HNF1 β -Wildtyp.....	43
4.2	Funktion von HNF1 β in der Entwicklung des Pronephros und Metanephros	44
4.3	Fehlbildung des Pronephros durch P328L329	47
4.4	Die Bedeutung von HNF1 β in der Entwicklung von Hinterhirn, Ohr und Auge.....	50
4.5	Die Bedeutung von HNF1 β in der Entwicklung der Neuralleiste.....	52
4.6	Unterschiede der Proteinfunktionen von HNF1 α und HNF1 β	54
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	57
6	LITERATURVERZEICHNIS	58

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen und Tabellen

Lebenslauf

Danksagung

1 Einleitung

1.1 Die gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren HNF1 α und HNF1 β

Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF1 α (hepatocyte nuclear factor 1 α) gehört zusammen mit dem nah verwandten Faktor HNF1 β zur POU-Homeodomänen-Proteinfamilie (Gehring et al., 1994). Die Gene der beiden HNF1-Proteine liegen auf unterschiedlichen Chromosomen und sind in Vertebraten hoch konserviert mit Homologen im Fisch (Deryckere et al., 1995; Sun et al., 2001), im Frosch (Bartkowski et al., 1993; Demartis et al., 1994) und beim Säuger, einschließlich des Menschen (Frain et al., 1989; Bach et al., 1991). Beim Menschen befindet sich das HNF1 α -Gen auf dem Chromosom 12 und das HNF1 β -Gen auf dem Chromosom 17 (Bach et al., 1991). Von HNF1 α und HNF1 β sind beim Menschen jeweils drei Isoformen (A, B und C) beschrieben worden, die auf alternatives Spleißen der Primärtranskripte zurückgehen. Mit Ausnahme von HNF1 β -C, das Reportergene nicht aktiviert und in Koexpressionsstudien als transdominanter Inhibitor wirkt, sind alle HNF1-Isoformen Transaktivatoren. Die Isoformen von HNF1 α sind jedoch stärkere Aktivatoren als die von HNF1 β (Bach und Yaniv, 1993).

In Abb. 1 ist die Domänenstruktur von HNF1 α und HNF1 β schematisch dargestellt. Am N-terminalen Ende befindet sich eine Dimerisierungsdomäne, die eine Homo- und Heterodimerisierung der beiden Proteine erlaubt. Die DNA-bindende Domäne besteht aus zwei verschiedenen Bindungsmotiven, einer POU-spezifischen (POU_S) und einer Homeodomäne (POU_H). Die Homeodomäne der HNF1-Proteine ist einzigartig, da sie eine zusätzliche Sequenz von 21 Aminosäuren zwischen den α -Helices 2 und 3 aufweist (Finney, 1990). In den beiden DNA-bindenden Domänen ist die Homologie zwischen dem HNF1 α - und HNF1 β -Protein mit 98% beziehungsweise 93% am höchsten, gefolgt von der Dimerisierungsdomäne mit 75%. Die C-terminale Transaktivierungsdomäne, die ungefähr die Hälfte des Proteins darstellt, ist hingegen zwischen den beiden Proteinen relativ gering (47%) konserviert (Cereghini, 1996). Aufgrund der besonderen Homeodomäne und der hohen Homologie bilden HNF1 α und HNF1 β eine eigene Unterfamilie innerhalb der POU-Homeodomänen-Proteine (HNF1-Familie; Gehring et al., 1994). In der Embryogenese der Maus werden HNF1 α und HNF1 β zusammen im Dottersackentoderm, in der sich entwickelnden Leber, Niere, Pankreas und im Magen-Darm-Trakt exprimiert. Die zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster der HNF1-Proteine differieren jedoch (Ott et al., 1991; Lazzaro et al., 1992; Cereghini et al., 1992; Barbacci et al., 1999; Coffinier et al., 1999). HNF1 β tritt deutlich früher auf als HNF1 α , seine Expression beginnt bereits in den frühesten

Stadien der Entwicklung dieser Organe. Nur HNF1 β ist ab Tag 4,5 bis 7,5 *post coitum* im primitiven und visceralen Entoderm exprimiert und ab Tag 9,5 bis 11 auch in der Leber-, Pankreas- und Ureterknospe (Barbacci et al., 1999). HNF1 α erscheint erst um den Tag 8,5 *post coitum* im visceralen Entoderm des Dottersacks und am Tag 10,5 in der Leber- und Pankreasknospe (Cereghini et al., 1992). HNF1 β wird zudem in der sich bildenden Neuralröhre, der Lunge und dem Genitaltrakt exprimiert, während HNF1 α hier nicht auftritt (Barbacci et al., 1999; Coffinier et al., 1999). Das in der Embryonalentwicklung entstandene Expressionsmuster der HNF1-Gene wird, mit Ausnahme der neuronalen Expressionsdomäne von HNF1 β , im adulten Organismus beibehalten (Pontoglio et al., 1996; Barbacci et al., 1999; Coffinier et al., 1999).

Die embryonalen Expressionsmuster der HNF1-Proteine scheinen in Vertebraten evolutionär konserviert worden zu sein. Im *Xenopus*-Embryo wird HNF1 β vor HNF1 α exprimiert (Pogge v. Strandmann et al., 1997) und nur HNF1 β tritt im Neuroektoderm auf (Demartis et al., 1994).

Das Ausschalten der HNF1-Gene in der Maus hat unterschiedliche Auswirkungen auf die Entwicklung der Embryonen. In Übereinstimmung mit dem embryonalen Expressionsmuster, versterben HNF1 β -defiziente Embryonen kurz nach der Implantation aufgrund eines fehlgebildeten visceralen Entoderms und eines stark disorganisierten Ektoderms (Barbacci et al., 1999; Coffinier et al., 1999). Im Gegensatz dazu ist HNF1 α für die normale Entwicklung der Mäuse entbehrlich. Die HNF1 α -defizienten Mäuse entwickeln jedoch nach der Geburt hepatische, pankreatische und renale Dysfunktionen (Pontoglio et al., 1996). Eine genauere Analyse der HNF1 α -defizienten Mäuse zeigte eine gestörte Insulinsekretion in den Betazellen des Pankreas (Pontoglio et al., 1998). Die heterozygote Inaktivierung der HNF1-Gene hatte hingegen keine phänotypischen Auswirkungen.

1.2 HNF1-Genmutationen beim Menschen

Heterozygote Mutationen im HNF1 α - und HNF1 β -Gen sind mit MODY (maturity-onset diabetes of the young) assoziiert. Dabei handelt es sich um eine Form des familiären, nicht insulin-abhängigen Diabetes mellitus, der durch eine frühe Manifestation, meist vor dem 25. Lebensjahr, und durch eine autosomal dominante monogene Vererbung charakterisiert ist. Der primäre Defekt ist dabei eine Funktionsstörung der Betazellen des Pankreas, der zu einem Insulinsekretionsdefekt führt (Hattersley, 1998; Froguel und Velho, 1999). Mutationen im HNF1 α -Gen (Subtyp MODY3) sind die häufigsten Gendefekte, die mit MODY assoziiert sind. Zu Beginn dieser Arbeit waren mehr als 80 verschiedene HNF1 α -Mutationen bekannt (Froguel und Velho, 1999). HNF1 β -

Genmutationen (Subtyp MODY5) scheinen hingegen eine seltene Ursache für MODY zu sein (Beards et al., 1998). Lediglich zwei Mutationen waren in der Literatur beschrieben worden: die Nonsense-Mutation R177X (Horikawa et al., 1997) und die Frameshift-Mutation A263fsinsGG (Nishigori et al., 1998). Beide Mutationen führen zu stark verkürzten Proteinen von 176 beziehungsweise 264 Aminosäuren. In beiden Familien ist die Mutation zusätzlich mit schweren Nierenerkrankungen assoziiert.

In der R177X-Familie leiden zwei Mutationsträger unter einer chronischen Niereninsuffizienz und ein Betroffener unter einer Proteinurie (Horikawa et al., 1997). Die Nierenerkrankungen wurden jeweils nach dem Diabetes diagnostiziert und unterscheiden sich nicht von diabetischen Nephropathien.

In der zweiten Familie haben die Probandin und deren Schwester eine verminderte Nierenfunktion und Nierenzysten. Der Vater zeigt eine terminale Niereninsuffizienz, Nierenzysten und eine milde Proteinurie, die 20 Jahre vor der Diagnose des Diabetes festgestellt wurde. Die HNF1 β -Mutation wurde auch bei dem zweijährigen Sohn der Probandin und der fünfjährigen Tochter der betroffenen Schwester gefunden. Beide Kinder haben eine Nierendysfunktion und Nierenzysten, jedoch keinen Diabetes. Bei dem Jungen wurden in einer Ultraschalluntersuchung in der 27. Schwangerschaftswoche bereits Nierenanomalien festgestellt: Die fetalen Nieren waren vergrößert und es gab Hinweise auf Nierenzysten (Nishigori et al., 1998). Es fällt auf, dass alle identifizierten Mutationsträger (5) der A263fsinsGG-Familie eine Nierendysfunktion mit Nierenzysten aufweisen. In drei Fällen wurden die Nierendysfunktion und/oder die Nierenzysten vor dem Auftreten des Diabetes festgestellt.

Eine dritte HNF1 β -Mutation, P328L329fsdelCCTCT, fand die Arbeitsgruppe von A. T. Hattersley (University Exeter, UK) bei einer Probandin von 22 Jahren mit Diabetes in deren zweiter Schwangerschaft. Die Daten zu dieser Mutation wurden hier zur Verfügung gestellt und später in Bingham et al. (2000) veröffentlicht. Die HNF1 β -Mutation war bei der Probandin neu aufgetreten und wurde an ihre beiden Kinder weitergegeben. Die erste Schwangerschaft wurde in der 17. Woche aufgrund schwerer Nierenfehlbildungen des Fetus abgebrochen. Die fetalen Nieren waren durch multiple, das gesamte Nierenparenchym ausfüllende Zysten stark vergrößert. Das Nierenbeckenkelchsystem, die Harnleiter und die Harnblase waren vorhanden, jedoch verkleinert. Eine normale Nephrogenese ließ sich histologisch nicht feststellen. Gelegentlich waren zystische Glomeruli und primitive Tubuli zu sehen. Fehlbildungen anderer Organe, wie sie für die autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung oder für das Meckel'sche Syndrom beschrieben sind, ließen sich makroskopisch nicht nachweisen. Das allgemeine Erscheinungsbild

ähnelt einer zystischen Nierendysplasie, ist jedoch nicht eindeutig klassifizierbar. Die zweite Schwangerschaft führte zur Geburt eines Jungen. Dieses Kind hatte eine nicht funktionelle multizystische dysplastische rechte Niere und eine dysplastische linke Niere sowie eine beeinträchtigte Nierenfunktion. Eine Ultraschalluntersuchung in der 18. Schwangerschaftswoche zeigte bereits eine multizystische rechte Niere. Die Probandin selbst hatte wenige Nierenzysten mit einer milden Nierendysfunktion.

Insgesamt zeigten die verfügbaren Daten, dass bei HNF1 β -Mutationsträgern gehäuft Nierenerkrankungen mit Nierenzysten auftraten. In drei Fällen wurden Nierenanomalien bereits vor der Geburt festgestellt, was auf einen Defekt in der Nierenentwicklung hindeutet. Insbesondere der histologische Befund der Nieren des 17 Wochen alten Fetus legt dies nahe. Mutationen im HNF1 β -Gen könnten somit nicht nur eine Ursache für MODY sein, sondern auch Nierenfehlbildungen hervorrufen.

Allerdings kommen bei Neugeborenen diabetischer Mütter häufiger Fehlbildungen vor. Das Risiko für Fehlbildungen liegt 2-7,9fach über demjenigen von stoffwechselgesunden Frauen. Das Spektrum der assoziierten Fehlbildungen umfasst insbesondere Herzfehler, Neuralrohrdefekte, Skelettanomalien und Nierenfehlbildungen, darunter auch das vollständige Fehlen der Nierenanlage (renale Agenesie) (Mironiuk et al., 1997; Lynch et al., 1997; Schaefer-Graf et al., 2000). Eine keimsschädigende Wirkung von Glucose ist tierexperimentell belegt (Sakamaki et al., 1999). Da bei zwei der drei betroffenen Kinder ein manifester Diabetes der Mutter während der Schwangerschaft vorlag und in einem Fall eine diabetische Stoffwechsellaage der Mutter während der Schwangerschaft nicht auszuschließen ist, könnten die mit der HNF1 β -Mutation assoziierten Nierenfehlbildungen auch diabetische Embryopathien darstellen.

Das Expressionsmuster von HNF1 β stützt die Hypothese, dass HNF1 β -Genmutationen Nierenfehlbildungen verursachen können. Lazzaro et al. (1992) untersuchten mittels In-situ-Hybridisierung die Expression von HNF1 α und HNF1 β in der Entwicklung der Rattenniere. HNF1 β -Transkripte waren in der frühen induktischen Phase der Nierenentwicklung (Tag 12,5 *post coitum*) in der Ureterknospe sowie in den Zellkondensationen des metanephrogenen Blastems nachzuweisen; später auch in allen Stadien der Differenzierung des Zellaggregats zum Nephron. Das HNF1 α -Gen wird hingegen sehr viel später aktiv (Tag 15,5 *post coitum*), erst wenn die Differenzierung in die verschiedenen funktionellen Segmente des Nephrons bereits begonnen hat. Auch im ausdifferenzierten Nephron unterscheiden sich die Expressionsmuster von HNF1 β und HNF1 α . Die Expression von HNF1 α beschränkt sich auf den proximalen und distalen Tubulus, während HNF1 β zusätzlich in den Sammelröhren exprimiert ist.

Aufgrund seines Expressionsmusters könnte HNF1 β sowohl in der frühen induktischen Phase der Nierenentwicklung als auch in der späteren Zelldifferenzierung eine Rolle spielen, während HNF1 α erst in der postinduktischen Phase auftritt, und zwar nur in Zellen, die auf eine tubuläre Differenzierung festgelegt sind (Lazzaro et al., 1992).

HNF1 α -defiziente Mäuse leiden an einem schweren Fankoni-ähnlichen Syndrom mit Polyurie, Glucosurie, allgemeiner Aminoazidurie und Phosphaturie, die durch eine Dysfunktion der proximalen Tubuli verursacht wird. Die makroskopische Untersuchung der Mäuse ergab keine Auffälligkeiten in der Nierenstruktur (Pontoglio, 1996). Das homozygote Ausschalten des HNF1 β -Gens führt hingegen zum Absterben der Embryonen noch vor der Gastrulation. Dies verhinderte bisher eine Analyse der Funktion von HNF1 β in der Nierenentwicklung.

1.3 *Xenopus laevis* als Modellorganismus

Der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* wird seit den 1950er Jahren als Modellorganismus für die Untersuchung früher Entwicklungsvorgänge genutzt. Ein großer Vorteil von *Xenopus* ist die einfache Gewinnung befruchteter Eier, da sich die Oozytenreifung und Ovulation in weiblichen Tieren das ganze Jahr über hormonell stimulieren lässt. Der Laich eines Geleges enthält dann durchaus mehrere Tausend Eier, die man *in vitro* befruchten kann. Die Embryonen entwickeln sich in einer einfachen Salzlösung. Eine Fütterung der Larven ist etwa bis zum sechsten Tag der Entwicklung nicht notwendig. Bis dahin haben sich die wichtigsten Organsysteme gebildet und sind funktionell. Da die Larven transparent sind, kann die Entwicklung innerer Organe am lebenden Tier beobachtet werden.

Aufgrund seiner Größe und externen Entwicklung ist der Froschembryo besonders für die Mikroinjektionstechnik geeignet. So kann die Funktion eines Gens durch Überexpression des Wildtyps oder einer mutierten Sequenz untersucht werden, indem man mRNA in das befruchtete *Xenopus*-Ei oder in ausgewählte Blastomeren des frühen Embryos mikroinjiziert. Die resultierenden phänotypischen Veränderungen in der Embryonalentwicklung erlauben oft Rückschlüsse auf die normale Funktion des untersuchten Gens. So wurden beispielsweise Mitglieder der TGF (transforming growth factor)-, FGF (fibroblast growth factor)- und Wnt-Proteinfamilie als wichtige Faktoren bei der Mesoderminduktion und Achsenbildung identifiziert (Heasman, 1997). Auf molekularer Ebene können die phänotypischen Veränderungen durch Analyse der Expression geeigneter Markergene im intakten Embryo mittels In-situ-Hybridisierung und Immunohistochemie näher charakterisiert werden (Sive et al., 2000).

Die injizierte mRNA wird in der Regel effizient translatiert und durch Injektion in bestimmte Blastomeren kann die Überexpression auf spezifische Regionen im Embryo gerichtet werden. Da die erste Teilungsebene den *Xenopus*-Embryo für gewöhnlich in eine rechte und linke Seite teilt, ist es möglich, durch Injektion von nur einer Blastomere des Zweizellembryos die Überexpression auf eine Embryoseite zu beschränken. Die nicht manipulierte Seite des Embryos kann dann als Kontrollseite dienen. Die Expression der exogenen mRNA lässt sich zudem durch Koinjektion von mRNA lokalisieren, die für ein Markerprotein kodiert, wie etwa der β -Galactosidase oder dem GFP (green fluorescent protein). Ein Nachteil der mRNA-Injektion ist die transiente Expression. Die mRNA wird unmittelbar nach der Injektion translatiert und im Verlauf der Embryonalentwicklung abgebaut. Sie ist demnach nur begrenzt stabil und Untersuchungen der Vorgänge während der Organogenese lassen sich nur bedingt durchführen. Mit der Mikroinjektionstechnik wurden deshalb vor allem Faktoren untersucht, die frühe Entwicklungsprozesse (von der Befruchtung bis zur Neurulation) steuern.

1.4 Der Pronephros aus *Xenopus* als Modellsystem für das Studium der Nephrogenese

Eine Besonderheit in der Nierenentwicklung besteht darin, dass drei aufeinanderfolgende Nierengenerationen entstehen: Pronephros (Vorniere), Mesonephros (Urnieren) und Metanephros (Nachnieren). Die Entwicklung der nächstfolgenden Generation hängt von der vorausgehenden ab. Bei Säugern entwickeln sich alle drei Nierengenerationen, der Pronephros ist jedoch nur in Spuren vorhanden und ohne physiologische Bedeutung. Der Mesonephros stellt hier die funktionelle embryonale Niere dar, der später durch den Metanephros ersetzt wird, aus dem schließlich die adulte Niere hervorgeht. Bei Fischen und Amphibien hingegen ist der Pronephros ein exkretorisches Organ und in der larvalen Lebensphase unverzichtbar. Der Pronephros degeneriert und seine Funktion wird vom Mesonephros übernommen, aus dem sich dann die adulte Niere entwickelt (Vize et al., 1997; Carroll et al., 1999; Brändli, 1999).

Die drei Nierenformen unterscheiden sich hauptsächlich in der Anzahl und Anordnung der Nephrone, den Funktionseinheiten der Vertebratennieren. Die einfach strukturierten Nieren (Pro- und Mesonephros) enthalten etwa 1-50 Nephrone, während der Metanephros bis zu einer Millionen Nephrone aufweisen kann. Die wohl einfachste Vertebratenniere ist der Pronephros von *Xenopus*. Er besteht im Prinzip nur aus einem einzelnen großen Nephron, ist paarig angelegt und hat drei funktionelle Einheiten: Glomus, Tubuli und Ductus (Nieuwkoop und Faber, 1975; Abb. 2). Der Glomus stellt eine vaskuläre Filtrationseinheit dar, die Abfallstoffe aus dem Blut ins Zölom abgibt. In Anuren, zu denen *Xenopus* zählt, verbinden für gewöhnlich drei mit Zilien besetzte Wimpern-

trichter (Nephrostome) das Zölom mit den Pronephros-Tubuli. Die Zilien in den Nephrostomen schwemmen die Zölomflüssigkeit mit den Abfallstoffen in die Tubuli (Nierenkanälchen), die unterschiedliche funktionelle Abschnitte aufweisen. Im proximalen Abschnitt werden Nährstoffe und Salze resorbiert, im distalen Wasser. Die Tubuli sind von einem Blutkapillarnetz umgeben, in das die resorbierten Substanzen und das Wasser gelangen. Der Urin wird schließlich über den Ductus (auch als Wolffscher Gang bezeichnet) zur Kloake transportiert und ausgeschieden (Vize et al., 1997; Carroll et al., 1999; Brändli, 1999).

Das intermediäre Mesoderm, welches Somiten und Seitenplattenmesoderm verbindet, bildet das Ausgangsmaterial für alle drei Nierenformen. In *Xenopus* entwickelt sich der Pronephros aus dem Somato- und Splanchnopleura des intermediären Mesoderms. Die Spezifizierung des Mesoderms zu Vorläuferzellen des Pronephros erfolgt in der frühen Neurula (Stadium 12/13). Das erste morphologische Anzeichen der Pronephros-Entwicklung ist in der späten Neurula (Stadium 20/21) zu beobachten. Es besteht in einer leichten Verdickung im somatischen Bereich des intermediären Mesoderms unterhalb der Somiten 3-5, die durch Zellformveränderungen der Pronephros-Vorläuferzellen hervorgerufen wird. Im Schwanzknospenembryo (Stadium 24) breitet sich diese Verdickung bis zum Somiten 6 aus. Die Pronephros-Vorläuferzellen bilden ein kompaktes Aggregat, in dem die Zellen radial angeordnet sind (ab dem Stadium 25). Aus dem antero-dorsalen Bereich dieser Anlage differenzieren sich die Tubuli und aus dem postero-ventralen Bereich der Ductus (Stadium 30-38). Etwa im gleichen Zeitraum entwickelt sich auf der gegenüberliegenden Seite des Zöloms aus der Splanchnopleura des intermediären Mesoderms der Glomus, die dritte Komponente des Pronephros. In der 2,5 Tage alten Larve (Stadium 37/38) sind alle drei Komponenten des Pronephros funktionell. Seine Komplexität nimmt jedoch weiterhin zu durch das Verlängern und Aufwinden der Tubuli. In der 5 Tage alten Larve (Stadium 47) ist dieser Prozess abgeschlossen (Vize et al., 1997; Carroll et al., 1999; Brändli, 1999). Die Entwicklung der Tubuli kann in der lebenden Larve beobachtet werden. Ductus und Glomus sind nicht sichtbar, sie lassen sich jedoch relativ einfach durch Whole-mount-Immunfärbung oder In-situ-Hybridisierung im ganzen Tier visualisieren.

Der einfache Aufbau des *Xenopus*-Pronephros sowie die einfache Manipulation und Analyse der Genexpression machen den Amphibienembryo zu einem idealen System für die Untersuchung der Nephrogenese. Desweiteren ließ sich eine Vielzahl von Genen identifizieren, die während der Entwicklung des *Xenopus*-Pronephros exprimiert werden. Interessanterweise sind von diesen Genen einige essenziell für die Entwicklung des Metanephros in der Maus. Man nimmt daher an, dass konservierte Gene die Entwicklung der beiden Nierenformen regulieren (Vize et al., 1997;

Carroll et al., 1999; Brändli, 1999). Im Folgenden sollen drei Gene vorgestellt werden, um dies zu verdeutlichen.

In der Nephrogenese der Maus wird der Transkriptionsfaktor Lim-1, der zu den Lim-Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren gehört, zuerst im Seitenplattenmesoderm und später in der Nierenleiste, die sich vom intermediären Mesoderm ableitet, exprimiert. In der weiteren Entwicklung ist Lim-1 in den Tubuli des Pro-, Meso- und Metanephros aktiv. Das Expressionsmuster deutet auf eine frühe Funktion von Lim-1 in der Spezifizierung der Niere hin. Der Phänotyp entsprechender Knock-out-Mäuse unterstützt diese Annahme. Lim-1-defizienten Mäusen fehlt der Pro-, Meso- und Metanephros (Shawlot und Behringer, 1995). Das orthologe Gen in *Xenopus*, Xlim-1, zeigt ein sehr ähnliches Expressionsmuster. Es wird zum Zeitpunkt der Spezifizierung des Pronephros in der prospektiven Pronephros-Anlage exprimiert (späte Gastrula, Stadium 13), später in der Pronephros-Anlage und in den sich entwickelnden Tubuli sowie im Ductus (Taira et al., 1994).

Ein weiteres Beispiel ist Wnt-4, das zur WNT-Signalproteinfamilie gehört und für die Umwandlung von Mesenchym zu Epithel eine wichtige Bedeutung hat. Mäuse mit inaktiviertem Wnt-4-Gen können keine Zellaggregate im metanephrogen Mesenchym bilden und damit auch keine Tubuli (Stark et al., 1994). Das Expressionsmuster des orthologen Gens in *Xenopus* lässt eine ähnliche Funktion in der Entwicklung des Pronephros vermuten. Wnt-4 wird in der späten Neurula (Stadium 18) in der anteriodorsalen Region der zukünftigen Pronephros-Anlage exprimiert, aus der die Tubuli hervorgehen (Carroll et al., 1999).

Als drittes Beispiel sei das Wilms-Tumor-Gen (WT1) genannt, das für einen Transkriptionsfaktor mit Zinkfingerdomäne kodiert. Bei diesem Beispiel wurde der *Xenopus*-Pronephros bereits als Modellsystem für die Untersuchung der Nephrogenese erfolgreich eingesetzt. WT1 wird in der Nephrogenese der Maus in zwei unterschiedlichen Domänen exprimiert: in der frühen Entwicklung in den sich verdichtenden Zellen des metanephrogenen Mesenchyms und in späteren Stadien ausschließlich in den Podozyten der Glomeruli. Das Expressionsmuster lässt eine Funktion von WT1 in der Entwicklung der Tubuli und der Glomeruli vermuten. Knock-out-Mäuse mit inaktiviertem WT1 belegen dies zum Teil. Das metanephrogene Mesenchym degeneriert und es werden keine Nieren gebildet (Kreidberg et al., 1993). Die Bedeutung von WT1 in der Glomeruli-Entwicklung ließ sich bei diesen Mäusen jedoch nicht klären. In der Entwicklung des *Xenopus*-Pronephros, ist die Expression des orthologen Gens xWT1 von Anfang an auf die vaskuläre Komponente, den Glomus, beschränkt. Wallingford et al. (1998) injizierten xWT1-kodierende mRNA in *Xenopus*-Embryonen und stellten fest, dass dadurch die Entwicklung der Pronephros-

Tubuli noch vor der morphologischen Differenzierung (Stadium 21) gehemmt wird. Wie die Autoren daraus schließen, könnte die Funktion von xWT-1 und WT-1 darin bestehen, die Expression von Tubuli-spezifischen Genen in Zellen zu hemmen, die die vaskuläre Komponente der Niere bilden.

Auch die HNF1-Gene weisen ähnliche Expressionsmuster in der Entwicklung des Säuger-Metanephros und *Xenopus*-Pronephros auf. HNF1 β -Transkripte sind noch vor einer morphologischen Differenzierung des Pronephros im Somatopleura des intermediären Mesoderms nachweisbar (mittlere Neurula, Stadium 16), später auch in der Pronephros-Anlage und in den sich entwickelnden Tubuli sowie Ductus (Demartis et al., 1994). HNF1 α hingegen wird deutlich später exprimiert, erst wenn die Differenzierung des Pronephros bereits fortgeschritten ist (Schwanzknospenembryo, Stadium 30). Wie im Metanephros ist die Expression von HNF1 α auf die Tubuli beschränkt (Pogge von Strandmann et al., 1997).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst die funktionellen Eigenschaften von HNF1 β , der HNF1 β -Mutante P328L329fsdelCCTCT und von HNF1 α molekularbiologisch charakterisiert werden. Damit sollte geklärt werden, wie sich die Mutation P328L329fsdelCCTCT auf die DNA-Bindung, die Dimerisierung und das Transaktivierungspotential des Genprodukts auswirkt. Als zweites wichtiges Ziel sollten die funktionellen Eigenschaften der drei Proteine in der Nephrogenese untersucht werden. Dafür wurde der *Xenopus*-Pronephros als Modellsystem gewählt. Mittels Überexpression im *Xenopus*-Embryo sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Welche Bedeutung hat HNF1 β in der Entwicklung des Pronephros?
- Beeinträchtigt die HNF1 β -Mutante die Entwicklung des Pronephros?
- Induzieren HNF1 α und HNF1 β unterschiedliche Pronephros-Phänotypen?
- Zu welchen phänotypischen Veränderungen führen die Überexpressionen von HNF1 β , der HNF1 β -Mutante und von HNF1 α ?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Puffer und Enzyme

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Lösungen und Puffer, deren Zusammensetzung nicht gesondert vermerkt ist, wurden nach den Protokollen der Methodensammlung von Sambrook et al. (1989) hergestellt. Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme für DNA und RNA stammten von den Firmen AGS (Heidelberg), Boehringer Mannheim, Eurogentec (Seraing, Belgien), Gibco BRL (Eggenstein), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Pharmacia (Freiburg) und Stratagene (Heidelberg).

2.2 Standardmethoden

Molekularbiologische Techniken, wie Anzucht und Transformation von Bakterien, Modifikationen von DNA oder Gelelektrophoresen, wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die Präparation großer Mengen Plasmid-DNA mit dem Plasmid Maxi Kit von Qiagen (Hilden).

2.3 Plasmidkonstrukte

2.3.1 Expressionskonstrukte

Myc-Rc/CMV-HNF1 β : Zur Synthese dieses Konstrukts wurde der cDNA-Klon, der für das humane HNF1 β -A (vHNF1-A in Bach et al., 1991) kodiert, mittels PCR unter Verwendung der Primer 5'-GGCAAAGCTTCCATGGTGTCCAAGCTCACG-3' (vorwärts) und 5'-CCATCTAGACGTCCGTCAGGTAAGC-3' (rückwärts) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit *Hind*III und *Xba*I restringiert und in den Expressionsvektor Myc-Rc/CMV inseriert. Dieser enthält als Fusionspartner sechs Myc-Epitope aus dem Vektor pCS⁺MT. Der vHNF1-A-Klon wurde von Moshe Yaniv (Institut Pasteur, Paris) zur Verfügung gestellt.

Myc-Rc/CMV-P328L329: Dieses Konstrukt kodiert die HNF1 β -Mutante P328L329fsdelCCTCT (Bingham et al., 2000). Es wurde mit Hilfe des QuickChangeTM Site Directed Mutagenese Kit (Stratagene, Heidelberg) hergestellt. Als Matrize diente das HNF1 β -Wildtypkonstrukt Myc-Rc/CMV-HNF1 β . Die Mutation wurde durch Verwendung der beiden komplementären Primern

5'-CAGCCTGAACGCTCTCCCAC-3' und 5'-GTGGGAGAGCGTTCAGGCTG-3' in das Wildtypkonstrukt eingeführt.

Myc-Rc/CMV-HNF1 α : Dieses Konstrukt kodiert das humane mit 6 Myc-Epitopen markierte HNF1 α -A (Wild et al., 2000).

pCSGFP2: Dieses Konstrukt enthält die cDNA-Sequenz einer GFP-Variante bei der die Fluoreszenzintensität durch Einführen der beiden Mutationen F64L und S65T verstärkt werden konnte (Zernicka-Goetz et al., 1996). Es wurde von Enrique Amaya (Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt.

Die Konstrukte Myc-Rc/CMV-HNF1 β und Myc-Rc/CMV-P328L329 wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die inserierten cDNAs wurden mittels Sequenzierung überprüft (M. Bulman, University Exeter, UK).

2.3.2 Luciferasereporterkonstrukte

Xalb(-662/+19)luc: Das Albuminpromotorfragment -662/+19 wurde durch Restriktion mit *HinDIII* und *XhoI* aus dem Plasmidkonstrukt (-662/+19)albumin-CAT (Schorpp et al., 1988a) isoliert und in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pXP2 (Nordeen, 1988) kloniert. Das Promotorfragment stammt aus dem *Xenopus*-Albumingen und enthält eine HNF1-Bindestelle.

XHNF1 α (-594/-207)luc: Das *Xenopus*-HNF1 α -Promotorfragment -594/-207, das zwei HNF1-Bindestellen enthält, ist in den Vektor pXP1 kloniert (Weber et al., 1996).

(HP1)4tk-luc: Vier Kopien der HNF1-Bindestelle aus dem *Xenopus*-Albumingen sind vor dem Thymidinkinasepromotor des Vektors pT81luc kloniert (Drewes et al., 1994).

Das Konstrukt Xalb(-662/+19) wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt.

2.4 In-vitro-Translation von Proteinen

Zur In-vitro-Synthese der HNF1-Proteine wurde eine gekoppelte Transkription/Translation (TNT) im Kaninchen-Reticulocytenlysat (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Synthese erfolgte mit den Expressionskonstrukten Myc-Rc/CMV-HNF1 α , Myc-Rc/CMV-HNF1 β und Myc-Rc/CMV-P328L329 sowie der T7-RNA-Polymerase. Für die Synthese von radioaktiv markierten Proteinen wurde dem Ansatz ³⁵S-Methionin (Amersham Buchler,

Braunschweig) zugegeben. Anschließend wurden 5 µl des TNT-Reaktionsansatzes in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis der HNF1-Proteine erfolgte autoradiographisch (X-Omat Röntgenfilme von Integra, Fernwald).

2.5 Gelretardationsanalyse

Gelretardationsanalysen mit *in vitro* synthetisierten, nicht radioaktiv markierten HNF1-Proteinen wurden wie in Lemm et al. (1999) beschrieben durchgeführt. Ein Gelretardationsansatz enthielt: 2 µl des TNT-Reaktionsansatzes, 100 ng Lachssperma-DNA als unspezifischen Kompetitor und gegebenenfalls 1 µl des HNF1 α -spezifischen Antikörpers RAD1 (Bartkowsky et al., 1993) oder 0,1 µl Anti-HNF1 β -Serum (Lemm et al., 1999). Eine erste Inkubation erfolgte in einem 15 µl-Ansatz in GRBB (10 mM HEPES (pH 7,6), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 4% Ficoll) für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurden 40.000 cpm (5 µl-Ansatz in GRBB) ³²P-markiertes HP1-Oligonukleotid zugegeben und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die entstandenen Protein-DNA-Komplexe wurden in einem 4%igen Polyacrylamidgel in 0,25 x TBE für 1,5 Stunden bei 100 V aufgetrennt, das Gel getrocknet und für etwa 12 Stunden mit einem Kodak X-Omat Film (Integra, Fernwald) belegt.

Sequenz des HP1-Oligonukleotids: 5'-AGCTTGAGGTTAATAATTTTCCA-3'

3'-ACTCCAATTATTAAAAGGTCTTAG-5'

Das HP1-Oligonukleotid, das die HNF1-Bindestelle aus dem *Xenopus*-Albuminpromotor enthält (Lemm et al., 1999), wurde in einer Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase und [α -³²P]-dCTP (Amersham Buchler, Braunschweig) nach Sambrook et al. (1989) markiert und anschließend mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.6 Kultur von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen (Zervixkarzinomzelllinie des Menschen) wurden bei 37°C, 7,2% CO₂ und 95% wassergesättigter Atmosphäre in DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium, Biochrom) mit je 100 U/ml Penicillin und Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 10% hitzeinaktivierten fötalen Kälberserum (Biochrom) kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen subkonfluenten Kulturen einmal mit Ca²⁺/Mg²⁺-freien PBS gewaschen, mit 0,05% Versen-Trypsin bedeckt und nach zwei- bis vierminütiger Inkubation in frischem Kulturmedium suspendiert.

2.7 Transiente Transfektion von HeLa-Zellen

Plasmidkonstrukte wurden mittels Lipofektion in HeLa-Zellen eingeschleust. Dazu wurden 3×10^5 Zellen in 3 ml Vollmedium (siehe 2.6) in eine 3,3 cm Zellkulturschale (6-Loch-Platte) ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. 1,6 µg Plasmid-DNA wurde mit Optimem (Gibco, BRL) in einem Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt. Jeder Transfektionsansatz enthielt 1,3 µg Reportergen- und 0,3 µg Expressionskonstrukt, wobei gegebenenfalls die Menge an Expressionskonstrukt durch Zugabe des Expressionsvektors ohne cDNA-Insert auf 0,3 µg aufgefüllt wurde. Der Transfektionsansatz bestand aus 100 µl Plasmid-DNA, 6 µl Lipofectamin (Gibco, BRL) und 94 µl Optimem. Der Ansatz wurde für 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die HeLa-Zellen je einmal mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS und Optimem gewaschen. Dem Transfektionsansatz wurden 800 µl Optimem zugegeben und die Mischung auf die Zellen aufgetragen. Nach fünfstündiger Inkubation unter Kulturbedingungen wurde das Transfektionsgemisch gegen 2,5 ml Vollmedium ausgetauscht und die Zellen bis zur weiteren Verwendung kultiviert.

2.8 Bestimmung der Luciferaseaktivität

Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden HeLa-Zellen 18-20 Stunden nach der Transfektion zweimal mit 4°C-kaltem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen, mit 80 µl Lysereagenz (25 mM Trisphosphat (pH 7,8), 2 mM DTT, 2 mM CDTA, 10% Glycerol, 1% Triton-X-100) überschichtet und nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit einem Gummispatel von der Kulturfläche gelöst. Die Zelltrümmer wurden sedimentiert (5 Minuten bei 10000 rpm) und vom Überstand wurden 20 µl mit Hilfe des Luciferase Assay Systems (Promega) in einem Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) analysiert.

2.9 Statistische Auswertung der Transfektionsdaten

Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm Microsoft Office Excel 2007 durchgeführt. Unterschiede wurden als signifikant bewertet, wenn nach dem Student'schen t-Test $p < 0,05$ war.

2.10 Indirekte Immunfluoreszenz von HeLa-Zellen

Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden 3×10^5 HeLa-Zellen in 3,3 cm Zellkulturschalen ausgesät und wie in 2.7 beschrieben transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit eiskaltem Methanol fixiert (10 Minuten), bei Raumtemperatur getrocknet (5 Minuten) und dreimal mit PBS gewaschen, wobei der Puffer beim dritten Waschschrift für 10 Minuten auf den Zellen verblieb. Durch Inkubation mit 10% Ziegenserum in PBS für 1 Stunde bei 4°C wurden unspezifische Bindungen abgesättigt. Als Erstantikörper diente der monoklonale Antikörper 9E10 (Evan et al., 1985), der gegen das Myc-Epitop gerichtet ist. Er wurde in einer Verdünnung von 1:4 in DMEM auf die zuvor mit PBS gewaschenen Zellen gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben mehrmals mit PBS gewaschen und ein Cy3-gekoppelter Zweitantikörper (Ratte anti Maus IgG, Dianova, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:200 in PBS/10% Ziegenserum auf die Zellen gegeben und für 1 Stunde bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die fixierten Zellen mit Mounting-Medium (Vectashield, Vector Laboratories) eingedeckelt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Inverses Mikroskop IM35+ICM405, Zeiss) ausgewertet.

2.11 Western-Blot-Analyse

Für die Western-Blot-Analysen wurden *in vitro* translatierte Proteine (5 µl des TNT-Reaktionsansatzes, siehe 2.4) mit einem Volumen zweifachen Probenpuffers nach Laemmli (1970) versetzt und für 2 Minuten bei 95°C denaturiert. Gesamtzellextrakte von Hela-Zellen (8 µl des Überstandes nach Zelllyse, siehe 2.8) wurden mit einem Volumen fünffachen Probenpuffers gemischt und für 3 Minuten bei 95°C denaturiert. Proteinextrakte von *Xenopus*-Embryonen (zwei Embryo-äquivalente, siehe 2.19) wurden mit einem Volumen fünffachen Probenpuffers versetzt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine sowie eines Proteinmarker-Kits (Prestained SDS molecular weight standard mixture, Sigma, Deisenhofen) erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in 10% SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli (1970). Der anschließende Elektrotransfer der Proteine auf Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schüll, Dassel) wurde mit Hilfe einer Trans-Blot-SD-Kammer (Biorad, München) bei 2 mA/cm^2 für 1 Stunde durchgeführt. Nach Waschen der Membran mit PBS wurden die unspezifischen Bindungen durch eine einstündige Inkubation mit 5% Blocking-Reagenz (Amersham Buchler, Braunschweig) in PBS/0,1% Tween20 bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper 9E10 (Evan et al., 1985), der gegen das Myc-Epitop gerichtet ist, erfolgte für 90 Minuten bei Raumtemperatur in einer 1:5 Verdünnung in PBS/0,1% Tween20. Anschließend

wurde die Membran mehrmals in PBS/0,1% Tween20 bei Raumtemperatur gewaschen. Die Inkubation mit dem 1:5000 in PBS/0,1% Tween20 verdünnten Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (Schaf anti Maus Antikörper IgG, Dianova, Hamburg) erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS/0,1% Tween20 wurde zur Detektion des Zweitantikörpers das ECL (enhanced chemoluminescence)-System (Amersham Buchler, Dassel) nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.12 Haltung von *Xenopus laevis*

Adulte Frösche der Gattung *Xenopus laevis* wurden von der Firma *Xenopus I* (Ann Arbor, USA) bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte durch das Zentrale Tierlaboratorium am Universitätsklinikum Essen. Zwischen zwei induzierten Laichablagen wurde für die Weibchen eine mindestens drei Monate währende Regenerationspause eingehalten.

2.13 Gewinnung von *Xenopus*-Embryonen

Weiblichen Fröschen wurde, in Abhängigkeit von ihrer Größe, 600–800 Einheiten humanes Choriongonadotropin (Pregnesin, Serono, Unterschleißheim) subkutan in den dorsalen Lymphsack injiziert, um die Eiablage zu stimulieren. Etwa 15 Stunden nach der Injektion ließ sich frischer Laich durch leichte Massage des Bauchs und der Flanken des Weibchens gewinnen. Um eine synchrone Entwicklung zu gewährleisten, wurden die Eier künstlich befruchtet. Hierzu wurde ein adultes Männchen in 0,5% MS222 (3-Aminobenzoatethylester, Sigma, Deisenhofen) tief narkotisiert und dessen Hoden entnommen. Diese wurden auf einem mit Holtfreter-Lösung (60 mM NaCl, 0,6 mM KCl, 0,9 mM CaCl₂, 0,2 mM NaHCO₃) getränktem Filterpapier bei 4°C für eine Woche gelagert und für mehrere In-situ-Fertilisationen eingesetzt. Die Eier wurden direkt nach der Ablage durch mehrmaliges Überstreichen mit einem Hodengewebestück befruchtet und nach 5 Minuten mit 0,1 x MBS (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 5 mM HEPES (pH 7,8), 2,5 mM NaHCO₃) überschichtet. Eine erfolgreiche Befruchtung zeigt sich nach etwa 30 Minuten durch die sogenannte kortikale Rotation, in der sich der dunkelpigmentierte Pol nach oben dreht. Zur Entfernung der Gallerthülle wurden die Eier etwa 50 Minuten nach der Befruchtung für maximal 90 Sekunden mit 2% Cysteinhydrochloridlösung (pH 7,8–8; Fluka, Ulm) behandelt, anschließend mehrmals mit Wasser gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in 0,1 x MBS kultiviert.

2.14 In-vitro-Transkription von RNA

Die Synthese von RNA *in vitro* erfolgte nach dem Protokoll von Nielsen und Shapiro (1986). Es wurden jeweils 3 µg linearisierter Vektor und 100 Einheiten RNA-Polymerase verwendet. Myc-Rc/CMV-Konstrukte wurden mit *KpnI* linearisiert und mit der T7-RNA-Polymerase transkribiert, während das GFP-Konstrukt mit *PvuI* linearisiert und mit der SP6-RNA-Polymerase transkribiert wurde. Nach der RNA-Synthese wurde das DNA-Template durch eine 15minütige Inkubation mit *DNaseI* (30 Units) abgebaut, die RNA zweimal mittels Phenolextraktion (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 24:24:1) gereinigt und danach mit Ethanol gefällt. Der Ansatz wurde in 4 Aliquot geteilt, die RNA mit Natriumacetat gefällt, sedimentiert und in 70% Ethanol bei –80°C gelagert. Die Bestimmung der RNA-Menge erfolgte photometrisch. Die Qualität der RNA wurde in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1% Agarosegel überprüft.

2.15 Mikroinjektion von RNA in *Xenopus*-Embryonen

Die zu injizierende RNA, die als Ethanolpräzipitat vorlag (siehe 2.14), wurde sedimentiert und in DEPC (Diethylpyrocarbonat)-behandeltem Aqua dest. gelöst. Zur Injektion wurden fein ausgezogene Mikrokapillaren (Durchmesser=0,58mm; World Precision Instruments, Sarasota, USA) verwendet. Die RNA-Lösungen wurden mit einer Injektionsapparatur (Picospritzer II, General Valve Corporation; USA) in den animalen Pol von Embryonen des Einzell- oder Zweizellstadiums injiziert. Es wurde jeweils ein Volumen von 10 nl injiziert, wobei unterschiedliche RNA-Mengen durch Variation der RNA-Konzentration zur Anwendung kamen. GFP-mRNA wurde mit HNF1-mRNA koinjiziert oder in Kontrollversuchen separat eingebracht. Dabei wurde stets die gleiche Menge an GFP-RNA (0,25 ng) injiziert. Um ein Auslaufen der Eier zu verhindern erfolgten die Injektionen in 0,1 x MBS/4% Ficoll 400. Die Embryonen verblieben in der Ficolllösung bis zum Gastrulastadium, die weitere Kultur erfolgte in 0,1 x MBS. Entwicklungsstadien wurden nach Nieuwkoop und Faber (1975) bestimmt.

2.16 Fixierung von *Xenopus*-Embryonen

Für die Fluoreszenzanalyse des Pronephros wurden *Xenopus*-Larven in verschiedenen Entwicklungsstadien in MEMFA (0,1 M MOPS (pH 7,4), 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 3,7% Formaldehyd) für 2 Stunden bei Raumtemperatur fixiert, anschließend in Methanol dehydriert und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C aufbewahrt (Harland, 1991). Für In-situ-Hybridisierungen

wurden *Xenopus*-Embryonen des Stadiums 20 von ihrer Vitellin-Membran befreit und wie oben beschrieben fixiert.

2.17 Aufreinigung von RNA aus *Xenopus*-Embryonen

Für die Präparation von RNA wurden 5 Embryonen des Stadiums 12,5 in 500 µl RNA-Clean (AGS, Heidelberg) durch kräftiges Pipettieren homogenisiert. Nach Zugabe von 50 µl Chloroform und fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde das Homogenat zentrifugiert (12 000 rpm, 15 Minuten, 4°C), der Überstand abgenommen und die RNA durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol gefällt. Nach einer 15minütigen Inkubation auf Eis wurde die RNA sedimentiert (12.000 rpm, 15 Minuten, 4°C), zweimal mit 70% eiskaltem Ethanol gewaschen und in 25 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch.

2.18 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die reverse Transkription wurde mit der SuperscriptII-reverse Transkriptase (Gibco BRL, Eggenstein) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 1,5 µg Gesamt-RNA (siehe 2.17) mit 1 µl Hexanukleotidprimer (0,1 mM) für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe der reversen Transkriptase wurde der Ansatz für 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Zur Kontrolle auf DNA-Kontamination wurde jeweils auch ein Ansatz ohne Enzym mitgeführt. Die anschließende PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl ausgeführt. Der Ansatz bestand aus: 1 x Goldstar-Reaktionspuffer (Eurogentec, Seraign), je 50 pmol Sense- und Antisense-Primer, 125 nM dNTPs, 0,5 mM MgCl₂, 0,4 Einheiten Goldstar-Taq- Polymerase und 0,1 µCi [α -³²P]dCTP (Amersham Buchler, Braunschweig). Zur Amplifikation der HNF1 α -cDNA wurden 5 µl und für die Amplifikation der ODC (Ornithindecarboxylase)-cDNA 2µl RT-Produkt als Template zugegeben.

Folgende Primer wurden für die PCR verwendet (Nastos et al., 1998):

HNF1 α :	5'-Primer	5'-CCTGAAGAGGCTGCTCATCAG-3'
	3'-Primer	5'-GTCCTGCATGTGTGAACTCTG-3'
ODC:	5'-Primer	5'-AATGGATTTCAGAGACCA-3'
	3'-Primer	5'-CCAAGGCTAAAGTTGCAG-3'

Die PCR-Bedingungen für die Amplifikation von HNF1 α waren: 2 Minuten bei 94°C; 35 Zyklen bestehend aus jeweils 45 sec bei 94°C; 1 Minute bei 54°C und 2 Minuten bei 72°C; 7 Minuten bei

72°C. Für die Amplifikation von ODC: 2 Minuten bei 94°C; 28 Zyklen bestehend aus jeweils 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 44°C; 1,5 Minuten bei 72°C und 7 Minuten bei 72°C.

Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurden 20 µl des PCR-Ansatzes in einem 6% Polyacrylamidgel analysiert. Auf die fixierten (10% Essigsäure, 10 Minuten) und getrockneten Gele wurde ein Kodak X-Omat Röntgenfilm (Integra, Fernwald) aufgelegt und 1-2 Tage exponiert.

2.19 Proteinextrakte aus *Xenopus*-Embryonen

Proteinextrakte von *Xenopus*-Embryonen (Stadium 12,5) wurden modifiziert nach Tylor et al. (1991) in Niedrig-Salz-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,9), 25% Glycerin, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM Benzamidin, 25 µg/ml Leupeptin, 25 µg/ml PepstatinA) hergestellt. Es wurden jeweils 4 Embryonen mit 12 µl Puffer durch Pipettieren homogenisiert. Nach Zentrifugation (50 000 rpm, 10 Minuten, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und bei -80°C gelagert.

2.20 Immunfluoreszenzanalyse des Pronephros

Für die Immunfluoreszenz wurden die fixierten Larven schrittweise in PBS rehydriert. Durch eine 15minütige Inkubation mit PBT (2mg/ml BSA, 0,1% Triton X-100 in PBS) sowie einer einstündigen Inkubation mit 10% Ziegenserum in PBT wurden die unspezifischen Bindungen abgesättigt. Als Erstantikörper dienten die pronephrosspezifischen Antikörper 3G8 und 4A6 (Vize et al., 1995), die als Hybridomaüberstände vorlagen und von E. A. Jones (University of Warwick, Coventry, UK) zur Verfügung gestellt wurden. Die Inkubation der Larven mit den Erstantikörpern in einer Verdünnung von 1:1 in PBT/10% Ziegenserum erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde fünfmal mit PBT gewaschen, wobei jeder Waschschrift mindestens 1 Stunde dauerte. Zur Detektion der pronephrosspezifischen Antikörper wurden die Larven mit einem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper (F(ab')₂ Ratte anti Maus IgG, Dianova, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:100 in PBT/10% Ziegenserum über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde zweimal für jeweils 2 Stunden mit PBT gewaschen. Alle Waschschriffe erfolgten bei Raumtemperatur. Nach der Färbung konnten die Larven, ohne großen Verlust der Fluoreszenzintensität, bis zu 5 Tage in PBT bei 4°C aufbewahrt werden.

2.21 Whole-mount-in-situ-Hybridisierung

Die In-situ-Hybridisierung wurde nach dem Protokoll von Harland (1991) durchgeführt. Zur Synthese der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden wurde das DIG-RNA-Labeling-Kit (Boehringer Mannheim) verwendet. Als Matrize diente der vollständige Xlim-1-cDNA Klon (Plasmid pXH32 bei Taira et al., 1992), der von Igor B. Dawid (National Institutes of Health, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Für die Synthese der RNA-Antisense-Sonde wurde das Plasmid pXH32 mit *XhoI* linearisiert und mit der T7-RNA-Polymerase transkribiert. Für die Synthese der RNA-Sense-Sonde wurde pXH32 mit *BamHI* linearisiert und mit der T3-RNA-Polymerase transkribiert.

Der Nachweis der X-Lim-1-Transkripte in den fixierten Embryonen erfolgte über Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente (Boehringer Mannheim), die kovalent an alkalische Phosphatase gekoppelt sind. Als Substrat für die Phosphatase wurde BM Purpel (Boehringer Mannheim) verwendet. Nach der Postfixierung in MEMFA und Dehydrierung in Methanol konnten die gefärbten Embryonen in 70% Ethanol bei –20°C aufbewahrt werden.

2.22 Analyse und fotografische Dokumentation von *Xenopus*-Embryonen

Für die Analyse der *Xenopus*-Embryonen wurde das Leica MZ FLIII Fluoreszenz-Stereomikroskop (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Benzheim) verwendet. Die spezifische Detektion von GFP erfolgte mit dem GFP-Plus-Fluoreszenzfilter, wobei freischwimmende Larven zur besseren Positionierung in 0,01% MS 222 (3-Aminobenzoatethylester, Sigma) narkotisiert wurden. Für die Analyse der Cy3-Fluoreszenz wurde ein geeigneter Grün-Fluoreszenz-Filtersatz (Anregungsfilter: 546/10 nm; Speerfilter: 590 nm) verwendet. Alle fotografischen Aufnahmen wurden mit der Kappa Kamera CF 15/4 MC(C) (KAPPA Messtechnik GmbH, Gleichen) und der dhs-Bilddatenbank (Dietermann & Heuser GmbH, Greifenstein) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der HNF1 β -Mutante P328L329fsdelCCTCT

Die von der Arbeitsgruppe von A.T. Hattersley (University Exeter, UK) identifizierte Frameshift-Mutation P328L329fsdelCCTCT des HNF1 β -Gens ist bei einem 17 Wochen alten Fötus mit Nierenzysten und fehlender Nephrogenese assoziiert (Bingham et al., 2000). Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob sich diese Mutation auf die funktionellen Eigenschaften des HNF1 β -Proteins auswirkt. Eine veränderte Funktion des mutierten HNF1 β -Proteins (im Folgenden auch als P328L329 bezeichnet) wäre ein weiterer Hinweis auf einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Mutation und beobachteter Nierenfehlbildung. Da das HNF1 β -Gen für einen Transkriptionsfaktor kodiert, wurden typische Eigenschaften dieser Proteinklasse untersucht, wie DNA-Bindung, Dimerisierungsvermögen und Transaktivierungspotential. Der strukturell nah verwandte Transkriptionsfaktor HNF1 α , der die gleiche DNA-Bindungsspezifität aufweist, wurde als zusätzliche Vergleichskontrolle in die Untersuchungen mit einbezogen.

3.1.1 Auswirkung auf die Proteinsequenz

Die P328L329fsdelCCTCT Mutation ist im Exon 4 des HNF1 β -Gens lokalisiert. Die hier durchgeführte Sequenzanalyse zeigt, dass die Deletion des Pentanukleotids CCTCT an den Codons 328 und 329 eine Verschiebung des Leserahmens (fs, frameshift) und die Ausbildung eines vorzeitigen Stopcodons zur Folge hat. Es entsteht ein stark verkürztes Protein von 356 Aminosäuren, das die ersten 327 Aminosäuren der Wildtypsequenz und aufgrund des Frameshifts eine neue Peptidsequenz von 29 Aminosäuren aufweist. Diese zeigt nur in 6 Positionen eine Übereinstimmung mit der Wildtypsequenz (Abb. 3A).

In dem mutierten Protein bleiben demnach die N-terminale Dimerisierungsdomäne sowie die POU-spezifische und POU-Homeodomäne erhalten, die für die spezifische DNA-Bindung wichtig sind. Die C-terminale Transaktivierungsdomäne ist jedoch weitgehend deletiert, von 244 Aminosäuren sind lediglich noch 14 vorhanden. Stattdessen hat das mutierte Protein eine neue Peptidsequenz von 29 Aminosäuren (Abb. 3B).

3.1.2 In-vitro-Expression der HNF1 β -Mutante

Für die Untersuchung der funktionellen Eigenschaften von P328L329 wurde die cDNA des humanen HNF1 β -Wildtyps in den Expressionsvektor Myc-Rc/CMV kloniert, der 6 N-terminale Myc-Epitope für die Markierung der Proteine bereitstellt. Die Mutation P328L329fsdelCCTCT wurde anschließend durch spezifische Mutagenese in das Wildtypkonstrukt eingeführt. Durch In-vitro-Translation im Kaninchen-Reticulocytenlysats-System wurde überprüft, ob die Mutation P328L329fsdelCCTCT zu dem vorhergesagten Molekulargewicht eines stark verkürzten HNF1 β -Proteins führt. Die Analyse im SDS-Proteingel zeigt dies deutlich (Abb. 4): Das Translationsprodukt des mutierten HNF1 β -Konstrukts (Spur 3) weist eine sehr viel höhere Mobilität auf als das Translationsprodukt des Wildtypkonstrukts (Spur 2). Dieses wandert im Bereich des errechneten Molekulargewichts von 72 kDa. Es weist eine etwas höhere Mobilität auf als das Translationsprodukt des HNF1 α -Konstrukts (Spur 1), da das HNF1 α -Gen für ein um 74 Aminosäuren längeres Protein kodiert (Bach und Yaniv, 1993).

3.1.3 DNA-Bindung und Dimerisierung der HNF1 β -Mutante

In P328L329 bleiben zwar die POU_S- und POU_H-Domäne, die für die Bindung des HNF1 β -Proteins an seine DNA-Erkennungssequenz wichtig sind, vollständig erhalten, jedoch könnte sich die starke Verkürzung und/oder die neue C-terminale Sequenz negativ auf seine DNA-Bindungsaktivität auswirken. Um dies zu prüfen, wurde P328L329 mit Hilfe des Reticulocytenlysats-Systems *in vitro* hergestellt und seine DNA-Bindungsaktivität in Gelretardationsexperimenten untersucht. Hierbei wurde das radioaktiv markierte HP1-Oligonukleotid, das die HNF1-Erkennungssequenz aus dem *Xenopus*-Albuminpromotor enthält (Lemm et al., 1999), zur Bindung eingesetzt.

Abb. 5 zeigt das Ergebnis der Gelretardationsanalyse. Das *in vitro* translatierte P328L329 bindet an das HP1-Oligonukleotid, da neben dem Signal des ungebundenen Oligonukleotids eine zusätzliche Bande mit deutlich verzögertem Laufverhalten auftritt (Spur 5). Dieser Komplex enthält P328L329, da durch Zugabe eines HNF1 β -spezifischen Antiserums, die Bindung an das HP1-Oligonukleotid verhindert wird beziehungsweise eine weitere Retardierung des Komplexes erfolgt (Spur 6). Aufgrund des geringeren Molekulargewichts von P328L329 (siehe Abb. 4) wandert der P328L329-enthaltende DNA-Komplex wesentlich schneller als die Protein-DNA-Komplexe, die das HNF1 β - oder HNF1 α -Protein aufweisen (Abb. 5, Spur 3 bzw. Spur 1). Die Überprüfung der

Spezifität dieser Komplexe erfolgte durch Zugabe eines HNF1 β -spezifischen Antiserums (Spur 4) beziehungsweise eines HNF1 α -spezifischen Antikörpers (Spur 2).

Auffallend ist, dass die P328L329-enhaltende Bande sehr viel stärker ausgeprägt ist als die des HNF1 β -Wildtyps (vergleiche Spur 5 mit Spur 3). Wie eine Western-Blot-Analyse der In-vitro-Translationsprodukte zeigte, kamen in der Gelretardationsanalyse jeweils etwa gleiche Proteinmengen zur Anwendung (Abb. 6B). Dies ist ein Hinweis darauf, dass P328L329 möglicherweise sogar eine höhere Affinität zu dem HP1-Oligonukleotid aufweist, als der HNF1 β -Wildtyp.

Da HNF1 β und HNF1 α als Homo- oder Heterodimere an die HNF1-Erkennungssequenz binden (zusammengefasst in Cereghini, 1996), wurde als nächstes untersucht, ob P328L329 noch mit den beiden Wildtypfaktoren interagiert. Dazu wurde das *in vitro* translatierte P328L329 mit dem ebenfalls *in vitro* translatierten HNF1 β oder HNF1 α gemischt und die Bindungsaktivität mit dem radioaktiv markierten HP1-Oligonukleotid analysiert. In jedem Reaktionsansatz konnte ein zusätzlicher Protein-DNA-Komplex mit intermediärem Laufverhalten detektiert werden (Abb. 5, Spur 10 und 11). Da das Molekulargewicht von P328L329 geringer ist als dasjenige von HNF1 β und HNF1 α (siehe Abb. 4), repräsentiert der intermediäre Komplex auch jeweils das entsprechende Heterodimer. Dabei wandert das HNF1 β -enthaltende Heterodimer (Spur 11) deutlich schneller als dasjenige, das HNF1 α enthält (Spur 10). Dies entspricht der Tatsache, dass HNF1 β um 74 Aminosäuren kleiner ist als HNF1 α (Bach und Yaniv, 1993). Wie erwartet zeigt das Heterodimer, bestehend aus HNF1 α und HNF1 β , die geringste Mobilität (Spur 12).

Insgesamt zeigen die Gelretardationsanalysen, dass das mutierte HNF1 β -Protein P328L329 sehr effizient an die HNF1-Erkennungssequenz aus dem Albuminpromotor bindet und mit den Wildtypfaktoren von HNF1 β und HNF1 α dimerisiert. Eine Beeinträchtigung der spezifischen DNA-Bindungsaktivität oder des Dimerisierungsvermögens konnte nicht festgestellt werden.

3.1.4 Transaktivierungspotential der HNF1 β -Mutante

In transienten Transfektionen wurde untersucht, ob sich die strukturellen Veränderungen des mutierten HNF1 β -Proteins P328L329 auf das Transaktivierungspotential auswirken. Dies war zu erwarten, da die Transaktivierungsdomäne in P328L329 weitgehend deletiert ist. Für die Untersuchung wurden HeLa-Zellen, die selbst keine HNF1-Proteine exprimieren, mit einem Promotor-Reportergen-Konstrukt und dem Expressionsvektor für das Myc-markierte P328L329, HNF1 β oder HNF1 α kotransfiziert. Bei dem verwendeten Promotor-Reportergen-Konstrukt

(HP1)4-tk-luc steht die Luciferase unter der Kontrolle eines synthetischen Promotors, der aus vier HNF1-Bindestellen und der TATA-Region des Thymidinkinasegens besteht (Drewes et al., 1994). In Voruntersuchungen ließ sich dieser Promotor von allen getesteten Reporter-Gen-Konstrukten am besten durch den HNF1 β -Wildtyp aktivieren, und schien deshalb besonders geeignet für die Untersuchung des Transaktivierungspotentials von P328L329 (Daten nicht gezeigt). Um eine mögliche Veränderung im Transaktivierungspotential genau erfassen zu können, wurde die Reporter-Gen-Aktivität in einem weiten Expressionsvektorbereich ermittelt (1,5 bis 300 ng).

In Abb. 6 ist das Ergebnis der Transfektionsexperimente dargestellt. Die Kotransfektion steigender Mengen des Expressionsvektors für den HNF1 β -Wildtyp resultiert in einer dosisabhängigen Aktivierung des Reportergens. Bereits bei Kotransfektion von 50 ng Expressionsvektor erreicht HNF1 β mit einer 10-fachen Aktivierung des Reportergens den Sättigungswert. Auch das stark verkürzte P328L329 ist in der Lage die Expression des Reportergens zu aktivieren. Die Transaktivierungsprofile von Mutante und Wildtyp unterscheiden sich jedoch grundlegend. So bewirkt die Kotransfektion steigender Mengen des Expressionsvektors für P328L329 ebenfalls eine dosisabhängige Aktivierung des Reportergens, ein Sättigungswert wird jedoch unter den gegebenen Bedingungen nicht erreicht. Zudem ist bei Kotransfektion geringer Expressionsvektormengen (1,5 bis 50 ng) das Transaktivierungspotential der Mutante gegenüber dem Wildtyp reduziert, während es überraschenderweise bei höheren Expressionsvektormengen (150 und 300 ng) verstärkt ist. Bei der untersuchten maximalen Expressionsvektormenge von 300 ng weist die Mutante mit einer 17,8-fachen Aktivierung des Reportergens sogar ein fast doppelt so hohes Transaktivierungspotential auf wie der Wildtyp.

Von HNF1 α ist bekannt, dass es in transienten Transfektionen Reportergene oft stärker aktiviert als HNF1 β (z.B. Ringeisen et al., 1993). Wie Abb. 6A zeigt, gilt dies auch für das hier gewählte Untersuchungssystem. In HeLa-Zellen wird durch Kotransfektion des Expressionsvektors für HNF1 α das Reporter-Gen-Konstrukt (HP1)4-tk-luc maximal 17,4-fach aktiviert. Dieser Wert entspricht auch dem maximal erreichten Transaktivierungspotential der HNF1 β -Mutante (siehe oben). Während aber HNF1 α das maximale Aktivierungspotential bereits durch Kotransfektion von 15 ng Expressionsvektor erlangt, sind bei der HNF1 β -Mutante hierzu 300 ng Expressionsvektor erforderlich.

Das vom Wildtyp abweichende Transaktivierungspotential von P328L329 könnte auf eine unterschiedliche Expression der beiden HNF1 β -Konstrukte beruhen. Um dies zu prüfen, wurden von transfizierten HeLa-Zellen Gesamtzellextrakte hergestellt und einer Western-Blot-Analyse unterzogen (Abb. 6B). Der spezifische Nachweis der HNF1 β -Proteine erfolgte dabei mit dem Antikörper 9E10, der gegen das Myc-Epitop gerichtet ist. Wie in Abb. 6B zu sehen, enthalten

Gesamtzellextrakte von HeLa-Zellen, die mit 5, 50 oder 300 ng der Expressionsvektoren für P328L329 und HNF1 β transfiziert worden waren, jeweils etwa gleiche Mengen an P328L329- und HNF1 β -Protein. Eine unterschiedliche Expression der beiden HNF1 β -Konstrukte in HeLa-Zellen ist demnach nicht die Ursache für das reduzierte bzw. erhöhte Transaktivierungspotential von P328L329.

Das erhöhte Transaktivierungspotential von P328L329 war insofern ein überraschendes Ergebnis, da das mutierte Protein nur einen kleinen Teil der ursprünglichen Transaktivierungsdomäne aufweist (siehe Abb. 3). Um auszuschließen, dass es einen Zusammenhang zwischen dem verwendeten Reportergen-Konstrukt (HP1)4tk-luc, in dem das Luciferasegen unter der Kontrolle eines synthetischen Promotors steht, und dem verstärkten Transaktivierungspotential von P328L329 gibt, wurden entsprechende Transfektionen mit dem Reportergen-Konstrukt Xalb(-662/+19) durchgeführt. Dieses enthält ein 681 bp großes Fragment des Albuminpromotors mit einer funktionellen HNF1-Bindestelle (Schorpp et al., 1988). Es wurde die Aktivierung von Xalb(-662/+19) nach Kotransfektion von 5 und 300 ng der Expressionsvektoren für P328L329, HNF1 β oder HNF1 α gemessen (Abb. 7). Die relativen Transaktivierungspotentiale entsprachen denjenigen, die mit dem synthetischen Promotor erzielt wurden, allerdings auf einem insgesamt niedrigeren Aktivierungsniveau. Das heißt bei Kotransfektion von 5 ng Expressionsvektor weist P328L329 im Vergleich zum HNF1 β -Wildtyp ein reduziertes und bei 300 ng Expressionsvektor ein verstärktes Transaktivierungspotential auf. Bei dieser hohen Expressionsvektormenge ist die HNF1 β -Mutante genauso aktiv wie HNF1 α , das ein um 47% höheres Aktivierungspotential aufweist als der HNF1 β -Wildtyp. Wie die statistische Auswertung der Daten zeigte, sind die ermittelten Unterschiede zwischen dem Transaktivierungspotential der HNF1 β -Mutante und des Wildtyps signifikant (Abb. 7).

Nachgewiesen wurde somit, dass P328L329 in der Lage ist Reportergene zu aktivieren. Das mutierte Protein hat jedoch ein anderes Transaktivierungspotential als der Wildtyp: Bei geringen Konzentrationen ist es reduziert und bei höheren verstärkt.

3.1.5 Intrazelluläre Lokalisation

Die Mutation P328L329fsdelCCTCT könnte sich auf die intrazelluläre Lokalisation von HNF1 β auswirken und damit zu dem modifizierten Transaktivierungspotential von P328L329 beitragen. Um dies zu untersuchen wurde das Wildtypprotein und P328L329 durch indirekte Immunfluoreszenz in transfizierten HeLa-Zellen lokalisiert.

Wie in Abb. 8 gezeigt wird, ist das exogen eingebrachte HNF1 β und P328L329 ausschließlich im Zellkern lokalisiert (Abb. 8B und C), während HNF1 α , das als Kontrolle mitgeführt wurde, zusätzlich im Zytoplasma vorliegt (Abb. 8A). Eine veränderte intrazelluläre Lokalisation kann daher als mögliche Ursache für das vom Wildtyp abweichende Transaktivierungspotential von P328L329 ausgeschlossen werden.

3.1.6 Einfluss der HNF1 β -Mutante auf die Wildtypaktivität

Da die Mutationsträger heterozygot für die Mutation P328L329fsdelCCTCT sind und das mutierte Protein mit dem Wildtyp Heterodimere bildet (siehe Abb. 5), war es wichtig zu untersuchen, inwieweit das Produkt des mutierten Allels die Funktion des Wildtypallels beeinflusst. Um die homo- und heterozygote Situation zu simulieren, wurden in transienten Transfektionsexperimenten die Expressionsvektoren für HNF1 β und P328L329 einzeln oder gemeinsam in HeLa-Zellen eingebracht. Zur Analyse der Aktivität der HNF1 β -Proteine wurde das Reportergenkonstrukt (HP1)4-tk-luc kotransfiziert, das bereits für die Charakterisierung des Transaktivierungspotentials von P328L329 verwendet worden war (siehe 3.1.4).

Zunächst wurde ein Expressionsniveau untersucht, in dem das mutierte Protein nur 25% der Wildtypaktivität aufweist (Abb. 9A). In diesem Bereich wäre eine dominant-negative Wirkung der Mutante möglich. Es wurden jeweils einzeln 5 und 10 ng der Expressionsvektoren für HNF1 β und P329L329 transfiziert, sowie gemeinsam jeweils 5 ng der Expressionsvektoren für HNF1 β und P328L329. Wie aus Abb. 9 hervorgeht, wird in der heterozygoten Situation (Kotransfektion von jeweils 5 ng der Expressionsvektoren für HNF1 β und P328L329) das Reportergen etwas schwächer aktiviert (um 19%) als in der entsprechenden homozygoten Wildtypsituation (Transfektion von 10 ng des Expressionsvektors für HNF1 β), die statistische Auswertung zeigte jedoch, dass dieser Unterschied nicht signifikant ist. Eine dominant-negative Wirkung der Mutante ist daher eher unwahrscheinlich.

Bei höheren Expressionsvektormengen aktiviert jedoch die Mutante das Reportergenkonstrukt (HP1)4-tk-luc deutlich stärker als der Wildtyp (Abb. 6A). Um auch diesen zweiten Wirkungsbereich von P328L329 zu analysieren, wurden jeweils einzeln 150 und 300 ng der Expressionsvektoren für HNF1 β und P328L329 transfiziert, sowie gemeinsam jeweils 150 ng der Expressionsvektoren für HNF1 β und P328L329. In Abb. 9B sind die Ergebnisse dieser Transfektionsexperimente dargestellt. In dem heterozygoten Versuchsansatz ist die Reportergenaktivität verglichen mit dem entsprechenden homozygoten Wildtypansatz signifikant erhöht (um

43%). Da aber der heterozygote Wert (14,7-fache Aktivierung des Reportergens) zwischen den Werten liegt, die man durch separate Transfektion des Wildtypkonstrukts (10,3-fache Aktivierung) und des mutierten Konstrukts (19,4-fache Aktivierung) erhält, scheint es sich hier nicht um einen direkten Einfluss des mutierten Proteins auf die Aktivität des Wildtyps zu handeln, sondern nur um den Beitrag seiner eigenen Aktivität. Eine dominant-positive Wirkung der Mutante ist daher eher unwahrscheinlich.

Insgesamt weisen die Transfektionsexperimente darauf hin, dass die Aktivität des HNF1 β -Wildtyps bei Koexpression des mutierten HNF1 β -Proteins P328L329 unbeeinflusst bleibt.

3.2 Überexpression von HNF1 β , P328L329 und HNF1 α im *Xenopus*-Embryo

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* synthetisierte mRNA, die für HNF1 β , P328L329 und HNF1 α kodiert, in frühe *Xenopus*-Embryonen injiziert. Es wurde untersucht, wie sich die Überexpression der drei Proteine auf die Entwicklung des Pronephros auswirkt. Desweiteren wurde untersucht, zu welchen phänotypischen Veränderungen die Überexpressionen von HNF1 β , P328L329 und HNF1 α führen.

3.2.1 Aktivierung der endogenen HNF1 α -Gentranskription

Die Überexpressionsstudien in *Xenopus* sollten mit den humanen Versionen von HNF1 β , P328L329 und HNF1 α durchgeführt werden. Um zu prüfen, ob diese in *Xenopus* funktionell sind, wurden die entsprechenden mRNAs in befruchtete *Xenopus*-Eier injiziert und mittels RT-PCR die Aktivierung eines potenziellen Zielgens der HNF1-Proteine untersucht. Das HNF1 α -Gen selbst schien dazu gut geeignet, da es in seiner Promotorregion zwei benachbarte HNF1-Bindestellen enthält (Abb. 10A). Diese beiden HNF1-Bindestellen sind, wie eine frühere Promotorstudie in *Xenopus* zeigte, für die korrekte embryonale Aktivierung des HNF1 α -Gens essentiell (Pogge von Strandmann et al. 1997). In transienten Transfektionen wurde zunächst geprüft, ob die humanen Myc-markierten HNF1-Proteine in der Lage sind, das Reportergenkonstrukt XHNF1 α (-594/-207)luc, das den *Xenopus* HNF1 α -Promotor mit den beiden HNF1-Bindestellen enthält, in HeLa-Zellen zu aktivieren. Die Transfektion von HNF1 α führte zu einer 7-fachen und die von HNF1 β zu einer 2,5-fachen Aktivierung des Luciferas-Reportergens (Abb. 10B). Als Kontrolle diente das Reportergenkonstrukt rHNF1 α (-886/46)luc, das den Promotor des Ratten-HNF1 α -Gens enthält,

der keine HNF1-Bindestellen aufweist. Dieses Konstrukt wird von HNF1 α und HNF1 β nicht aktiviert (Abb. 10B).

Für die Analyse im *Xenopus*-Embryo wurde 1 ng der *in vitro* synthetisierten mRNA, die für das humane Myc-markierte HNF1 α , HNF1 β und P328L329 kodiert, in befruchtete *Xenopus*-Eier injiziert. Als Marker für eine erfolgreiche Injektion wurde dabei stets 0,25 ng GFP (green fluorescent protein)-mRNA koinjiziert. Kontrollembryonen erhielten nur 0,25 ng GFP-mRNA. Im späten Gastrulastadium (Stadium 12,5) wurde aus grünfluoreszierenden Embryonen zum einen RNA isoliert und mittels RT-PCR analysiert. Zum anderen Proteinextrakte hergestellt und in einem Western-Blot untersucht. Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass in Embryonen des Entwicklungsstadiums 12,5 signifikante Mengen des humanen HNF1 α , HNF1 β und P328L329 vorliegen (Abb. 11). Die Proteinbanden sind etwa gleich stark, was für eine ähnliche Translationseffizienz der injizierten mRNAs spricht. Abb. 12A zeigt das Ergebnis der RT-PCR-Analyse. In nicht injizierten Kontrollembryonen des Stadiums 12,5 sind HNF1 α -Transkripte unter den gegebenen PCR-Bedingungen nicht nachweisbar (Spur 3). Die Injektion von HNF1 α - und HNF1 β -mRNA führt zu einer signifikanten Aktivierung des endogenen HNF1 α -Gens (Spur 5 und 6). Eine ähnlich starke Aktivierung des endogenen HNF1 α -Gens ist nach Injektion von P328L329-mRNA festzustellen (Spur 7 und 8). Die beobachteten Effekte sind spezifisch, da in Embryonen, die nur mit GFP-mRNA injiziert worden waren, HNF1 α -Transkripte nicht nachzuweisen sind (Spur 4). Zur Qualitätskontrolle der verwendeten RNA-Proben wurde die Menge der Ornithin-decarboxylase (ODC)-mRNA bestimmt, von der bekannt ist, dass sie in allen Stadien der Embryonalentwicklung konstant bleibt. Wie zu sehen, ist die Menge der ODC-Transkripte in allen untersuchten RNA-Proben etwa gleich, was die Richtigkeit der RNA-Messung belegt (Abb. 12A).

Dass tatsächlich die endogenen und nicht die injizierten humanen HNF1 α -Transkripte detektiert wurden, konnte durch eine *AccI*-Restriktionsanalyse der RT-PCR-Produkte bestätigt werden. Hierzu wurden die RT-PCR-Produkte aus dem Ansatz der HNF1 α -mRNA-injizierten Embryonen in einer zweiten PCR reamplifiziert und die Produkte mit dem Restriktionsenzym *AccI* behandelt und in einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 12B). Das unbehandelte PCR-Produkt weist wie erwartet eine Größe von 280 bp auf (Spur 2). Die *AccI*-Restriktion des 280-bp-Fragments führt zu zwei spezifischen Fragmenten von 210 und 70 bp (Spur 3). Da nur die *Xenopus* HNF1 α -Sequenz, nicht jedoch die humane, in dem PCR-amplifizierten Bereich eine *AccI*-Schnittstelle aufweist, ist dies ein Beleg dafür, dass in der RT-PCR-Analyse Transkripte des *Xenopus* HNF1 α -Gens nachgewiesen wurden.

Die Injektionsexperimente zeigen somit deutlich, dass das humane HNF1 α und HNF1 β wie auch das mutierte HNF1 β -Protein P328L329 in der Lage sind, das endogene HNF1 α -Gen im *Xenopus*-Embryo zu aktivieren. Dieses Ergebnis erlaubt nicht nur Rückschlüsse auf die Funktionalität der getesteten humanen HNF1-Proteine, sondern es gibt auch Hinweise zur Regulation des *Xenopus*-HNF1 α -Gens.

3.2.2 Auswirkung auf die Entwicklung des Pronephros

3.2.2.1 In-vivo-Beobachtung der Pronephros-Entwicklung

Um den Einfluss von HNF1 β , P328L329 und HNF1 α auf die Nephrogenese zu untersuchen, wurden *in vitro* synthetisierte mRNAs, die für das Myc-markierte HNF1 β , P328L329 und HNF1 α codieren, in *Xenopus*-Embryonen injiziert und die Entwicklung der Pronephros-Tubuli in der lebenden Larve untersucht. Dies ist möglich, da die Larven durch den sukzessiven Abbau des Dotters transparent werden und das Tubulknäuel des Pronephros direkt unter der Epidermis liegt.

In Voruntersuchungen wurden zunächst verschiedenen Mengen an HNF1-mRNA (0,5, 1 und 2 ng) in *Xenopus*-Embryonen injiziert. Die Injektionen erfolgten dabei unilateral im Zweizellstadium, so dass nur eine Körperhälfte der sich entwickelnden Embryonen die exogen eingeführte mRNA exprimiert. Um die manipulierte Seite zu kennzeichnen, wurde die HNF1-mRNA zusammen mit einer geringeren Menge an GFP-mRNA (0,25 ng) injiziert. Kontrollembryonen erhielten nur 0,25 ng GFP-mRNA. Zur Untersuchung einer möglichen natürlichen Varianz der Entwicklung der Pronephroi eines Tieres wurden auch nicht injizierte Embryonen kultiviert.

Bei frei schwimmenden Larven der Stadien 35/36 bis 40 erfolgte die Auswahl der Larven für die spätere Pronephros-Analyse. Es wurden nur solche Larven verwendet, deren GFP-Fluoreszenz sich auf die rechte oder linke Körperseite beschränkte. Das zweite Auswahlkriterium war eine eindeutig grünfluoreszierende Pronephros-Region, um zu gewährleisten, dass die koinjizierte HNF1-mRNA auch in diesen Bereich der Larve exprimiert wurde. Die Untersuchung der Pronephros-Entwicklung erfolgte schließlich bei freischwimmenden Larven der Stadien 45 bis 48. In diesen späten Entwicklungsstadien hat der Pronephros seine maximale Komplexität erreicht (Nieuwkoop und Faber, 1975). Von außen ist dies an den stark aufgewundenen Pronephros-Tubuli zu erkennen, die nun eine kompakte, kugelige Struktur bilden (Abb. 13).

Die makroskopische Untersuchung der nicht injizierten Kontrolllarven zeigte, dass die Tubulknäuel der beiden Pronephroi eines Tieres etwa gleich groß sind (N=250). Gleiches gilt für die Pronephroi von Larven, die als Zweizel Embryo mit 0,25 ng GFP-mRNA alleine (N=89) oder zusammen mit 0,5 ng HNF1 β -, P328L329- oder HNF1 α -mRNA injiziert worden waren (N=234). Ein signifikanter Unterschied in der Größe des Tubulknäuels zwischen der injizierten und nicht injizierten Seite war bei diesen Tieren makroskopisch nicht erkennbar (Larven nicht gezeigt).

Die Injektion von 1 ng HNF1 β -mRNA hatte jedoch einen deutlichen Effekt auf die Entwicklung des Pronephros. Wie durch die Larve in Abb. 13A exemplarisch gezeigt wird, konnte auf der injizierten Seite, die durch die grüne Fluoreszenz markiert ist, das Tubulknäuel des Pronephros vollständig fehlen (Abb. 13B). In anderen Larven war die Reduktion der Tubuli weniger stark ausgeprägt (nicht gezeigt). Aber auch die Injektion von 1 ng P328L329-mRNA führte zu einem sehr ähnlichen Pronephros-Phänotyp. Abb. 13C und D dokumentiert, dass die Expression von P328L329 die Entwicklung der Pronephros-Tubuli beeinträchtigt. Die Injektion von 1 ng HNF1 α -mRNA hatte hingegen keinen Einfluss auf die Entwicklung der Pronephros-Tubuli (Abb. 13E, F).

Innerhalb der Gruppe mit 2 ng HNF1-mRNA injizierten Larven wiesen ebenfalls nur die HNF1 β - und P328L329-injizierten Larven eine Reduktion der Pronephros-Tubuli auf. Da in dieser Gruppe die Sterblichkeits- und Missbildungsrate sehr hoch war, wurden die nachfolgenden Injektionsexperimente mit 1 ng der jeweiligen Test-mRNA durchgeführt.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Häufigkeit der beobachteten phänotypischen Veränderungen des Pronephros. Die Überexpression von HNF1 β führte bei 49% der untersuchten Tiere zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Tubulientwicklung, wobei 27% der Tiere eine Reduktion und 22% einen völligen Verlust der Pronephros-Tubuli aufwiesen. Die Überexpression von P328L329 hatte einen deutlich stärkeren Effekt auf die Entwicklung der Tubuli: 96% der Tiere zeigten eine anomale Entwicklung des Pronephros. Bei 42% waren die Tubuli reduziert und bei den übrigen fehlten diese vollständig. Die Überexpression von HNF1 α hatte hingegen keinen makroskopisch erkennbaren Effekt auf die Entwicklung der Pronephros-Tubuli. Dieser Befund belegt auch die Spezifität der bei HNF1 β - und P328L329-injizierten Larven beobachteten Fehlbildung des Pronephros.

3.2.2.2 Immunfluoreszenz-Analyse des Pronephros in den Stadien 45 bis 48

Die Pronephros-Analyse beschränkte sich bisher auf die von außen gut sichtbaren Tubuli. Um eine weitere Komponente des Pronephros, den Ductus, untersuchen zu können beziehungsweise um die bereits in lebenden Larven festgestellte Reduktion der Tubuli genauer zu charakterisieren, wurde der Pronephros durch Immunfluoreszenz visualisiert. Hierzu wurden die pronephrosspezifischen Antikörper 3G8 und 4A6 verwendet, die terminale Differenzierungsmarker der Tubuli und des Ductus erkennen (Vize et al., 1995).

Für die Untersuchung wurden *Xenopus*-Larven der Entwicklungsstadien 45 bis 48, die als Zweizellembryo unilateral mit 0,25 ng GFP-mRNA und 1 ng der mRNA für HNF1 β , P328L329 oder HNF1 α koinjiziert worden waren, verwendet (siehe 3.2.2). Insgesamt wurden 18 HNF1 β - und 10 P328L329-injizierte Larven mit einer bereits *in vivo* identifizierten Reduktion der Pronephros-Tubuli sowie 15 HNF1 α -injizierte Larven mit makroskopisch normal entwickelten Pronephroi analysiert.

Abb. 14 illustriert die Bandbreite der Pronephros-Phänotypen, die durch die Whole-mount-Immunfluoreszenz sichtbar wurden. HNF1 α -injizierte Larven wiesen auf der manipulierten Seite einen morphologisch normal entwickelten Pronephros auf. Wie die dorsale Ansicht in 14A zeigt, sind die beiden Pronephroi der HNF1 α -injizierten Larve gleich groß. In der lateralen Ansicht sind die stark aufgewundenen Tubuli zu erkennen. Der Ductus verläuft entlang der ventralen Kante der Axialmuskulatur. An seinem anterioren Ende ist er mit dem nicht gewundenen Abschnitt des distalen Tubulus verbunden und an seinem posterioren Ende, über das Rektaldivertikel, mit der Kloake (Abb. 14D und Vize et al., 1995). Bei einigen der HNF1 β - und P328L329-injizierten Larven fehlte auf der manipulierten Seite die pronephrosspezifische Fluoreszenz vollständig (gezeigt am Beispiel einer HNF1 β -injizierten Larve in Abb. 14B), was auf eine Hemmung der Entwicklung der Tubuli und des Ductus hindeutet. Die übrigen Larven zeigten eine substanzielle Reduktion des Pronephros (Abb. 14C, E-I). Davon betroffen waren die proximalen und distalen Tubuli. Zusätzlich konnte der Ductus reduziert sein (Abb. 14E, G) oder er schien sogar vollständig zu fehlen (Abb. 14F). In einigen Fällen war der Ductus mit zystenähnlichen Strukturen verbunden (Abb. 14I).

Die Immunfluoreszenz-Analyse bestätigt und erweitert die an lebenden Larven gewonnenen Daten. Die Überexpression von HNF1 β und P328L329 führt nicht nur zu einer Fehlbildung der Tubuli, sondern auch des Ductus. In einigen Fällen ließen sich keine Pronephros-Strukturen auf der injizierten Seite nachweisen, was eine vollständige Agenesie des Pronephros nahe legt. Die

Überexpression von HNF1 α scheint hingegen keinen Einfluss auf die Entwicklung des Pronephros zu haben.

3.2.2.3 Immunfluoreszenz-Analyse des Pronephros in den Stadien 35/36 bis 39

Um die in den HNF1 β - und P328L329-injizierten Larven identifizierte Fehlbildung der Pronephros-Tubuli weiter zu spezifizieren beziehungsweise um eine solche in HNF1 α -injizierten Larven auszuschließen, sollten nun auch die früheren Entwicklungsstadien 35/36, 37/38 und 39 mit den Antikörpern 3G8 und 4A6 untersucht werden. In den gewählten Stadien sind die einzelnen Komponenten des Tubulsystems bereits gut zu erkennen. Für die Immunfluoreszenz-Analysen wurden Zweizellembryonen unilateral mit 0, 25 ng GFP-mRNA und 1 ng HNF1-mRNA koinjiziert und bis zu den gewünschten Entwicklungsstadien kultiviert.

Abb. 15 zeigt Fluoreszenzaufnahmen injizierter Larven der Stadien 35/36 bis 39. Die nicht manipulierten Körperseiten der Larven weisen jeweils einen stadienspezifischen, phänotypisch normal entwickelten Pronephros auf: Es sind die drei dorsalen Äste und der vertikale Abschnitt des proximalen Tubulus zu sehen, die durch den Antikörper 3G8 markiert worden waren (Abb. 15A bis D). Im Stadium 35/36 sind die einzelnen Abschnitte des proximalen Tubulus noch relativ kurz und gerade (Abb. 15A und C). Ab dem Stadium 37/38 beginnen sich diese jedoch zu strecken und aufzuwinden (Abb. 15B und D). Der vertikale Abschnitt des proximalen Tubulus ist mit dem gewundenen distalen Tubulus verbunden, der um das Stadium 37/38 erstmals durch den Antikörper 4A6 markiert wird (Abb. 15B und D). Alle Abschnitte des proximalen Tubulus fluoreszieren gleich stark und sind gut von dem deutlich schwächer fluoreszierenden distalen Tubulus zu unterscheiden (Abb. 15B und D).

Wie durch die HNF1 β -injizierte Larve des Stadiums 35/36 in Abb. 15A demonstriert wird, konnte auf der manipulierten Seite die Pronephros-spezifische Fluoreszenz vollständig fehlen, während auf der Kontrollseite der proximale Tubulus mit seinen drei dorsalen Ästen zu sehen ist. In anderen Larven war auf der manipulierten Seite die Pronephros-spezifische Fluoreszenz stark reduziert, wie am Beispiel der P328L329-injizierten Larve des Stadiums 37/38 in Abb. 15B gezeigt wird. Davon betroffen war nicht nur der proximale, sondern auch der gewundene distale Tubulus (Abb. 15B). Solche Abweichungen von dem regulären Fluoreszenzmuster waren in HNF1 α -injizierten Larven weder für den proximalen (Abb. 15C und D) noch für den distalen Tubulus (Abb. 15D) festzustellen.

Insgesamt zeigten 30% der untersuchten HNF1 β -injizierten (N=10) und 57% der P328L329-injizierten Larven (N=7) eine stark reduzierte oder überhaupt keine Pronephros-spezifische Fluoreszenz. Bei den untersuchten HNF1 α -injizierten Larven war die pronephros-spezifische Fluoreszenz hingegen unverändert (N=41; davon waren 8 mit einer höheren Dosis, 2 ng, injiziert worden).

Aus den Immunfluoreszenz-Analysen in den Stadien 35/36 bis 39 geht hervor, dass die Überexpression von HNF1 β und P328L329 zu einer frühen Störung der Morphogenese des proximalen und distalen Tubulus führen kann, während die Überexpression von HNF1 α keinen Einfluss auf die Morphogenese der Tubuli hat.

3.2.2.4 Einfluss auf die Gentranskription von Xlim-1

Da HNF1 β bereits im Stadium 16 in der prospektiven Pronephros-Anlage exprimiert ist (Demartis et al., 1994), könnte die Fehlbildung der Tubuli und des Ductus auf frühe Entwicklungsstörungen zurückgehen. Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass in frühen Schwanzknospenembryonen, das erste von außen sichtbare Anzeichen der Pronephros-Entwicklung (Stadium 24, Nieuwkoop und Faber, 1975), eine kleine Erhebung der Epidermis in der Pronephrosregion, oft kleiner war oder fehlte. Um den beobachteten Pronephros-Phänotyp auf molekularer Ebene zu charakterisieren wurde die Expression eines frühen Markergens der Pronephrosentwicklung, Xlim-1 (Taira et al., 1994), in injizierten Embryonen untersucht. Es wurden Zweizelleembryonen unilateral mit 0,25 ng GFP- und 1 ng HNF1-mRNA koinjiziert. Ein Teil der einseitig grünfluoreszierenden Embryonen wurden im Stadium 20 fixiert und in Methanol aufbewahrt. Die übrigen dienten als Kontrolle für eine erfolgreiche Injektion. Im Stadium 45 zeigten die Kontrollembryonen den erwarteten Pronephrosphänotyp: Bei den P328L329- und HNF1 β -injizierten waren die Tubuli reduziert, während die HNF1 α -injizierten Larven einen normal entwickelten Pronephros aufwiesen (Larven nicht gezeigt). Die Häufigkeit der beobachteten Fehlbildungen entsprach dabei den in Tab. 1 aufgeführten. Bei den fixierten Embryonen wurde hierauf das räumliche Expressionsmuster von Xlim-1 mittels In-situ-Hybridisierung analysiert. Es konnte eine Xlim-1-Expression im dorsolateralen Bereich der Embryonen festgestellt werden, der sich zu den Pronephros-Tubuli und dem Ductus differenziert (Abb. 16). Die Spezifität der Färbung wurde in parallelen Ansätzen überprüft, in denen eine Sense-RNA-Sonde von Xlim-1 verwendet wurde. Bei diesen Embryonen fehlte die Färbung (nicht gezeigt). Wie aus Abb. 16 hervorgeht, gibt es Unterschiede im Xlim-1-Färbemuster zwischen der injizierten und nicht injizierten Seite eines Embryos hinsichtlich Ausdehnung und Intensität. Dieses Phänomen war unabhängig von der injizierten HNF1-mRNA zu

beobachten (Abb. 16A, D und C). Und auch bei nicht injizierten Kontrollembrionen des Stadiums 20 war eine ähnliche Variabilität im Xlim-1-Färbemuster zwischen den beiden Seiten eines Embryos festzustellen (Abb. 16D). Aufgrund des letzten Befundes scheinen die bei HNF1 β -, P328L329- und HNF1 α -injizierten Embryonen beobachteten Unterschiede im Xlim-1-Färbemuster eher nicht signifikant zu sein.

3.2.3 Auswirkung auf die Pigmentierung und Entwicklung des Kopfes

Die unilaterale Injektion von 1 ng HNF1 β - oder P328L329-mRNA resultierte in einigen Fällen, wie durch die P328L329-injizierte Larve in Abb. 17 demonstriert wird, in einer alleinigen Fehlbildung des Pronephros. Das heißt mit Ausnahme des fehlgebildeten Pronephros unterschied sich die manipulierte Seite rein äußerlich nicht von der Kontrollseite. Die Mehrzahl der HNF1 β - und P328L329-injizierten Larven zeigten jedoch noch andere Abweichungen vom normalen Phänotyp. So konnten auf der injizierten Seite eine veränderte Pigmentierung, eine Fehlbildung des Kopfskeletts, des Gehirns, des Auges und der Ohrkapsel beobachtet werden.

3.2.3.1 Veränderungen des Pigmentierungsmusters

HNF1 β - und P328L329-injizierte Larven wiesen eine reduzierte Pigmentierung des Epithels auf, das die Verdauungsorgane umgibt (Peritoneum). Nach Nieuwkoop und Faber (1975) findet die Pigmentierung des Peritoneums in den Entwicklungsstadien 40 bis 46 statt, wobei die dunkelpigmentierten Melanozyten in den Stadien 40 bis 43 und die gelbbraunen Xanthophoren im Stadium 46 erscheinen. Wie durch die HNF1 β - und P328L329-injizierte Larve des Stadiums 48 beziehungsweise 45 in Abb. 18A und B gezeigt wird, konnte die Zahl der dunkelpigmentierten Melanozyten im Peritoneum der injizierten Seite stark reduziert sein. Bei P328L329-injizierten Larven war eine zweite Pigmentierungsanomalie zu beobachten. Im Gewebe nahe dem Pronephros zeigte sich eine unregelmäßige punktförmige Pigmentierung (Abb. 18B und C), die bei einigen Larven auch im ventralen Bereich der Axialmuskulatur oder in der posterioren Kiemenregion auftrat (Abb. 18B bzw. C). Diese oberflächliche Pigmentierung war ausschließlich auf den manipulierten Seiten der Larven zu beobachten. Da bei nicht injizierten Kontrolllarven eine solche Pigmentierung nicht auftrat, handelt es sich hier um eine ektopische Pigmentierung. Die ektopischen Pigmentzellen sind sehr viel kleiner als die Melanozyten. Sie weisen auch nicht deren typische sternförmige Form auf (Abb. 18B). Die ektopische Pigmentierung und die reduzierte Pigmentierung des Peritoneums traten oft zusammen in einem Tier auf (Abb. 18B), konnten aber

auch getrennt beobachtet werden (Abb. 18C). Demnach scheinen sie voneinander unabhängige Störungen der normalen Pigmentierung darzustellen. Sie waren jedoch stets mit einer Fehlbildung des Pronephros assoziiert.

Tab. 2 gibt eine Übersicht über die Häufigkeit der beobachteten Pigmentierungs-Phänotypen. 50% der P328L329-injizierten Larven (N=44) wiesen eine reduzierte Pigmentierung des Peritoneums auf, während es bei den HNF1 β -injizierten Larven (N=40) lediglich 8% waren. Eine ektopische Pigmentierung zeigten 39% der P328L329-injizierten Larven (N=44). Diese ist P328L329-spezifisch, weder bei HNF1 β - noch bei HNF1 α -injizierten Larven war eine solche Pigmentierungs-anomalie zu beobachten. Alle HNF1 α -injizierte Larven zeigten ein reguläres Pigmentierungsmuster (N=51).

3.2.3.2 Fehlbildungen des Kopfes

Zu den auffälligsten morphologischen Veränderungen, die bei HNF1 β - und P328L329-injizierten Larven zu beobachten waren, zählte die disproportionierte Kopfentwicklung. Diese zeigte sich bereits im Schwanzknospenstadium: die Kopfregeion der injizierten Seite war schmaler als auf der Kontrollseite. Nach dem Schlüpfen der Larven wiesen viele dieser Embryonen eine leichte Krümmung des Kopfes zur injizierten Seite hin auf, die aber in späteren Entwicklungsstadien nicht mehr oder nur noch geringfügig vorhanden war (nicht gezeigt). Die asymmetrische Entwicklung des Kopfes wurde jedoch beibehalten.

Bei freischwimmenden Larven der Stadien 42 bis 48 ließ sich dann aufgrund der zunehmenden Transparenz die Entwicklung innerer Kopfstrukturen beobachten. Abb. 19 zeigt eine HNF1 β - und P328L329-injizierte Larve des Stadiums 45 beziehungsweise 46. Beide Larven weisen auf der injizierten Seite eine reduzierte Kiemenregion auf (Abb. 19C und E). Der Kiemenapparat ist, wie die ventrale Ansicht der HNF1 β -injizierten Larve demonstriert, nicht nur einfach verkleinert, sondern auch weniger klar strukturiert (Abb. 19D). So lassen sich auf der Kontrollseite der HNF1 β -injizierten Larve die einzelnen Branchialbögen (b1-b4) deutlich unterscheiden, während auf der injizierten Seite eine klare Anordnung von Kiemenskelettelementen nicht zu erkennen ist. Vielmehr erscheint die ganze Kiemenregion disorganisiert (Abb. 19D).

Zudem ist bei beiden Larven auf der injizierten Seite die anteriore Kopfregeion fehlgebildet. Das am weitesten rostral gelegene Skelettelement, der Meckel'sche Knorpel, scheint in der HNF1 β -injizierten Larve zu fehlen. Die P328L328-injizierte Larve zeigt sogar eine noch weiterreichende

Reduktion anteriorer Skelettelemente. Um welche Strukturelemente es sich hierbei genau handelt, ließ sich jedoch allein mit dem Stereomikroskop nicht klären.

Die Überexpression von HNF1 β und P328L329 kann somit zu einer Fehlbildung von branchialen und craniofacialen Skelettelementen führen. Die GFP-Fluoreszenz korrelierte dabei mit den beobachteten Skelettanomalien. Eine grüne Fluoreszenz bis zur Augenhöhe war mit dem branchialen Phänotyp assoziiert (nicht gezeigt). Reichte die Fluoreszenz darüber hinaus in den anterioren Kopfbereich, so waren zusätzlich craniofaciale Skelettelemente betroffen (Abb. 19B). Der Skelettphänotyp war auch in Larven mit einem makroskopisch normal entwickelten Pronephros auf der injizierten Seite zu beobachten (Abb. 19C und D).

Eine weitere auffällige Fehlbildung war die dorsale Wölbung des Gehirns (Abb. 20). Diese abnorme Entwicklung des Gehirns war mit dem oben beschriebenen Skelettphänotyp assoziiert und konnte in Larven mit und ohne Pronephros-Phänotyp beobachtet werden (Abb. 20 und nicht gezeigt).

Die Bildung eines kleineren Auges auf der injizierten Seite war, wie die HNF1 β -injizierte und P328L329-injizierten Larven in den Abbildungen 19 und 20 demonstrieren, ebenfalls mit einer reduzierten Kopfentwicklung assoziiert. Ob es sich hierbei um eine allgemeine Verkleinerung des Auges handelt, oder ob nur bestimmte Augenstrukturen davon betroffen sind, war von außen nicht zu erkennen.

Desweiteren konnte bei einigen der HNF1 β - und P328L329-injizierten Larven eine in ihrer Größe reduzierte und weniger strukturierte Ohrkapsel festgestellt werden (Abb. 21).

Tab. 3 gibt einen Überblick über die Häufigkeit der beobachteten phänotypischen Veränderungen des Kopfes. Bei den HNF1 β -injizierten Larven war mit einer Rate von 70% ein fehlgebildetes Kopfskelett der häufigste vorkommende Defekt. Es folgen mit deutlich geringeren Frequenzen ein kleineres Auge (28%) und ein abnormes Gehirn (23%). Eine ähnliche Verteilung der Fehlbildungen zeigen die P328L329-injizierten Larven. Auch hier ist mit 43% die Fehlbildung des Kopfskeletts am häufigsten vertreten. 34% der Larven hatten ein kleineres und lediglich 5% der Larven ein fehlgebildetes Gehirn.

Zur Häufigkeit der fehlgebildeten Ohrkapsel sind keine genauen Angaben möglich, da für die Beurteilung dieser Struktur eine hohe Transparenz erforderlich ist, und diese in den untersuchten Stadien nur von wenigen Larven erreicht wurde.

Die Injektion von HNF1 α -mRNA führte hingegen zu keinen der oben beschriebenen oder anderen Fehlbildungen. Die beobachteten Phänotypen beruhen auf der Anwesenheit des exogen eingeführten humanen HNF1 β und P328L329, sind also spezifische Effekte.

Insgesamt zeigen die Daten, dass die Überexpression von HNF1 β und P328L329 in *Xenopus* zu einer Fehlbildung des branchialen und craniofacialen Skeletts, des Gehirns, des Auges und Ohrkapsel führen kann.

4 Diskussion

4.1 Unterschiede im Transaktivierungspotential von P328L329 und HNF1 β -Wildtyp

Die HNF1 β -Genmutation P328L329fsdelCCTCT ist beim Menschen mit Nierenerkrankungen assoziiert (Bingham et al., 2000). Bisher sind in der Literatur nur drei Mutationsträger beschrieben worden und diese gehören einer Familie an. In einem Fall war die Mutation assoziiert mit nicht funktionellen zystischen Nieren bei einem 17-Wochen alten Fötus. In der vorliegenden Arbeit wurde die HNF1 β -Mutante funktionell charakterisiert.

Das mutierte HNF1 β -Allel kodiert für ein HNF1 β -Protein, das die ersten 327 Aminosäuren der Wildtypsequenz und, bedingt durch den Frameshift, eine neue Peptidsequenz von 29 Aminosäuren aufweist (Abb.3). Die N-terminale Dimerisierungsdomäne sowie die POU_S- und POU_H-Domäne, die für die DNA-Bindung wichtig sind, bleiben in dem mutierten Protein erhalten, während die C-terminale Transaktivierungsdomäne jedoch weitgehend deletiert ist. Die HNF1 β -Mutation P328L329fsdelCCTCT wurde durch gezielte Mutagenese in ein HNF1 β -Wildtypkonstrukt eingeführt. Die In-vitro-Expression dieses Konstrukts im Reticulocytenlysat und in kultivierten Zellen sowie *in vivo* im *Xenopus*-Embryo zeigte, dass die Mutation zu dem vorhergesagten Molekulargewicht eines stark verkürzten HNF1 β -Proteins führt (Abb. 4, 6 und 11). Die HNF1 β -Mutante bindet sehr effizient an das HP1-Oligonukleotid, das eine HNF1-Erkennungssequenz aufweist, und dimerisiert mit den Wildtypfaktoren von HNF1 β und HNF1 α (Abb. 5).

Trotz der starken Verkürzung aktiviert P328L329 in transienten Transfektionen Reportergene. Die Mutante weist jedoch ein anderes Transaktivierungspotential auf als der Wildtypfaktor: Während das Transaktivierungspotential des HNF1 β -Wildtyps bereits bei Transfektion geringer Expressionsvektormengen gesättigt ist, steigt das Transaktivierungspotential der HNF1 β -Mutante langsam an und geht bei höheren Expressionsvektormengen sogar über das Transaktivierungspotential des Wildtyps hinaus. Das unterschiedliche Transaktivierungspotential zeigt sich sowohl bei einem synthetischen als auch bei einem natürlichen Promotor (Abb. 6 und 7). Eine verschieden starke Expression des HNF1 β - und P328L329-kodierenden Konstrukts (Abb. 6) oder eine unterschiedliche Lokalisation der beiden Proteine in den transfizierten Zellen (Abb. 8) ließen sich als mögliche Ursachen für das vom Wildtyp abweichende Transaktivierungspotential ausschließen. Damit scheint das veränderte Transaktivierungspotential der Mutante auf intrinsischen Merkmalsunterschieden zu basieren, die die Transaktivierung direkt betreffen.

Da die HNF1 β -Mutante bei sättigenden Konzentrationen ein erhöhtes Transaktivierungspotential aufweist, könnte es sich bei der P328L329fsdelCCTCT-Mutation um eine so genannte Gain-of-function-(Funktionsgewinn-)Mutation handeln (Wild et al., 2000). Dabei scheint die neue C-terminale Sequenz von 29 Aminosäuren, die durch den Frameshift generiert wird, eine besondere Rolle zu spielen, denn die ähnlich stark verkürzte HNF1 β -Mutante Y352insA, die diese Sequenz nicht aufweist, erreicht bei sättigenden Konzentrationen nur die Aktivität des Wildtyps (Bohn et al., 2003). Eine eindeutige Klassifizierung der Mutante ist jedoch schwierig, da sie bei geringen Konzentrationen ein reduziertes Transaktivierungspotential aufweist und damit auch Eigenschaften einer Loss-of-function-(Funktionsverlust-)Mutation. Dies wird besonders deutlich, wenn man in die Untersuchung das Transaktivierungsprofil des strukturell nah verwandten HNF1 α mit einbezieht (Abb. 6). Bei jeder getesteten Expressionsvektormenge liegt das Transaktivierungspotential von HNF1 α über demjenigen von HNF1 β . HNF1 α ist in diesem Untersuchungssystem eindeutig der stärkere Transaktivator.

Die betroffenen Personen sind hinsichtlich der P328L329fsdelCCTCT-Mutation heterozygot. Es wurde daher untersucht, inwieweit das Produkt des mutierten Allels die Funktion des Wildtypproteins beeinflussen könnte. In Kotransfektions-Experimenten zeigte die Mutante weder eine dominant-negative noch eine dominant-positive Aktivität (Abb. 9).

Die P328L329fsdelCCTCT-Mutation ist auch mit MODY5 assoziiert (Bingham et al., 2000). Untersuchungen an einer Betazelllinie des Pankreas (INS-1) zeigten, dass die Mutante verglichen mit dem Wildtyp nur wenige Gene aktiviert (Thomas et al., 2004) und nur der Wildtyp, nicht jedoch die Mutante, beeinflusst die Apoptose und Insulinsekretion (Welters et al., 2006). In INS-1-Zellen scheint P328L329 daher eine Loss-of-function-Eigenschaft zu besitzen.

Die Ergebnisse der Transfektionsergebnisse zeigen, dass P328L329 ein anderes Transaktivierungspotential aufweist als der Wildtyp. Dieser Befund ist ein guter Hinweis auf einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der P328L329fsdelCCTCT-Mutation und den assoziierten Nierenerkrankungen.

4.2 Funktion von HNF1 β in der Entwicklung des Pronephros und Metanephros

Die Ergebnisse der Überexpressionsstudien im *Xenopus*-Embryo belegen, dass HNF1 β eine wichtige Funktion in der Nephrogenese hat. Die unilaterale Injektion von HNF1 β - mRNA in Zweizellembryonen führte in 49% der Fälle zu einer Fehlbildung des Pronephros auf der

manipulierten Seite der Larve (Abb. 13, Tab. 1). Der beobachtete Effekt ist spezifisch, da eine entsprechende Überexpression von HNF1 α keinerlei Auswirkungen auf die Morphogenese des Pronephros hatte. Wie die Immunfluoreszenzanalyse injizierter Larven der späten Entwicklungsstadien 45 bis 48 zeigte, konnten sowohl die Tubuli als auch der Ductus des Pronephros stark reduziert sein oder beide Strukturen fehlten sogar vollständig, was eine Agenesie des Pronephros nahelegt (Abb. 14). Die Untersuchung der Entwicklungsstadien 35/36 und 37/38 zeigten zudem, dass bereits die frühe Morphogenese des proximalen und distalen Tubulus beeinträchtigt ist (Abb. 15). Die beobachteten Pronephrosdefekte sind vereinbar mit dem Expressionsmuster von HNF1 β : Transkripte des HNF1 β -Gens sind von den frühesten Stadien an in den sich entwickelnden Tubuli und dem Ductus nachweisbar (Demartis et al., 1994). Um den Pronephrosdefekt auf molekularer Ebene zu charakterisieren, wurde die Expression eines frühen Markers der Pronephrosentwicklung, Xlim-1 (neue Bezeichnung *lhx1*), in injizierten Embryonen untersucht. Lim-1 kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der in der frühen Nephrogenese eine wichtige Rolle spielt. Mausembryonen mit inaktivierten Lim-1 bilden keinen Pro-, Meso- und Metanephros (Shawlot und Behringer, 1995). Durch In-situ-Hybridisierung wurde die Expression von Xlim-1 in Schwanzknospens-embryonen des Stadiums 20 visualisiert (Abb. 16). Xlim-1-Transkripte wurden im dorsolateralen Bereich der Embryonen lokalisiert, der sich zu den Pronephrostubuli und dem Ductus differenziert. Bei den HNF1 β - und P328L329-injizierten Embryonen konnte jedoch zwischen dem Xlim-1-Expressionsmuster der injizierten und nicht injizierten Seite kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, da bei den nicht injizierten Kontrollembryonen eine zu große Variabilität hinsichtlich des Xlim-1-Expressionsmusters vorlag.

Drews et al. (2011) fanden heraus, dass die Promotorregion von Xlim-1 eine funktionelle HNF1-Bindestelle aufweist und dass HNF1 β im animalen Kappen-Assay die Expression von Xlim-1 induziert. In dieser Untersuchung wurde HNF1 β -mRNA in den animalen Pol von *Xenopus*-Zweizellembryonen injiziert und in der späten Blastula (Stadium 9) Ektoderm explantiert (animale Kappe). Die Kappen wurden inkubiert und mittels RT-PCR die Aktivierung bestimmter Markergene der Pronephrosentwicklung untersucht. Da die Analyse der Kappen nach einer siebenstündigen Inkubation erfolgte, was etwa dem Entwicklungsstadium 12-13 (späte Gastrula/ frühe Neurula) entspricht, wurde von Drews et al. ein deutlich früheres Stadium untersucht als in der vorliegenden Arbeit (Stadium 20). Desweiteren wiesen Drews et al. eine Aktivierung der Gene *Osr 1* und *2*, *Pax8*, HNF1 α und Wnt11 β nach. Die Induktion des endogenen HNF1 α -Gens nach Injektion von HNF1 β -mRNA wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls gezeigt, jedoch im ganzen Embryo (Abb. 12). Aufgrund des zeitlichen Expressionsmusters von HNF1 α kann eine frühe Funktion dieses Gens in der Pronephrosentwicklung ausgeschlossen werden. Die Gene *Ors1*

und 2, Pax8, Wnt11 β sind zusammen mit Xlim-1 sehr frühe Marker der Pronephrogenese (Drews et al., 2011). Durch ihre Induktion im animalen Kappen-Assay stellen sie frühe Kandidatengene für die Untersuchung des Pronephrosphänotyps in HNF1 β - oder P328L329-injizierten Embryonen dar.

Bei der Maus führt die Inaktivierung des HNF1 β -Gens zum frühen Absterben der Embryonen aufgrund eines Defekts in der Ausbildung des visceralen Entoderms (Barbacci et al., 1999; Coffinier et al., 1999). Um diese zu umgehen, wählten Lokmane et al. (2010) die Technik der tetra- und diploiden Embryokomplementierung. Es wurden chimäre Mausembryonen hergestellt, in denen das tetraploide extraembryonale Gewebe HNF1 β exprimiert und der diploide Embryo für HNF1 β defizient ist. Wie die Autoren feststellen, ist HNF1 β eine zentrale Komponente regulatorischer Schaltkreise, die von großer Bedeutung sind für die Integrität des nephrogenen Gangs (Wolff'scher Gang), der Verzweigung der Ureterknospe und der frühen Nephrogenese. Im nephrogenen Gang ist HNF1 β wichtig für die Aufrechterhaltung der Expression von Pax2/Pax8 und Lim1, in der Spitze der Ureterknospe für die Etablierung des Ret-Gdnf-Wnt11-Signalsystems. HNF1 β reguliert direkt die Expression von Wnt9b, das von der Ureterknospe sezerniert wird, und damit die Initiation der Tubulogenese im metanephrogenen Mesenchym. Eine direkte Regulation durch HNF1 β wurde auch für die Gene Lim-1 und Pax2 gezeigt (Lokmane et al., 2010).

Gresh et al. (2004) untersuchten die Funktion von HNF1 β in späteren Stadien der Nierenentwicklung. Hier wurde HNF1 β mit der Cre-LoxP-Strategie nierenspezifisch im Mausembryo inaktiviert. Die Mäuse entwickelten polyzystische Nierenerkrankungen. Im Zystenepithel war die Expression von Umod, Pkhd1 und Pkd2 stark reduziert. Desweiteren zeigte sich, dass HNF1 β *in vivo* an Sequenzen in den genomischen Regionen dieser Gene bindet, was eine direkte Regulation durch HNF1 β nahe legt (Gresh et al., 2004). Beim Menschen verursachen Mutationen in UMOD, PKHD1 und PKD2 zystische Nierenerkrankungen (zusammengefasst in Ryffel, 2010). Die Mehrzahl der Gene, die bei zystischen Nierenerkrankungen mutiert sind, werden im primären Cilium der Nierenepithelzellen exprimiert, darunter auch die Proteinprodukte von Pkhd1 (Polyductin/Fibrocystein) und Pkd2 (Polycystein 2) (Gresh et al., 2004). Das primäre Cilium ist ein sensorisches Zellorganell, das mechanosensorische und andere Stimuli mit Mechanismen der Zellzykluskontrolle und der epithelialen Zellpolarität verbindet (Hildebrandt und Zhou, 2007). Die Untersuchung von Nierentubuluszellen in der Mitose ergab, dass die Ausrichtung der Teilungsspindeln entlang der Längsachse des Tubulus in HNF1 β -defizienten Mäusen gestört ist. Dadurch geht die planare Zellpolarität verloren, was zur Ausbildung eines breiteren Tubulus und zur Zystenbildung führt (Fischer et al., 2006).

Ein weiteres Zielgen von HNF1 β in der Niere ist Kif12 (kinesin family member 12) (Gong et al., 2009). Kif12 gilt in der Maus als Kandidatengen für die Ausprägung des Schweregrads der polyzystischen Nierenerkrankung. Da Mitglieder dieser Proteinfamilie eine Rolle spielen bei der richtigen Orientierung der Teilungsspindel während der Mitose, vermuten Gong et. al., dass die abnorme planare Zellpolarität, die bei zystischen Nierenerkrankungen zu beobachten ist, auf einer reduzierten Kif12-Expression basiert.

Zu Beginn der Mitose lösen sich im Allgemeinen die Transkriptionsfaktoren vom Chromatin. HNF1 β ist jedoch in den stark proliferierenden Tubuluszellen während der Mitose mit dem kondensierten Chromatin assoziiert (Verdeguer et al., 2010). Dies ermöglicht in der Interphase eine schnelle Reaktivierung der Zielgene von HNF1 β , die wichtig sind für die richtige Ausrichtung der Tubuluszellen.

Dudziak et al. (2008) identifizierten zwei neue Interaktionspartner von HNF1 β : E4F1 und ZFP36L1. Beide Proteine haben eine funktionelle Bedeutung in der Nephrogenese, wie ihre Überexpression in *Xenopus* zeigte. E4F1 ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der zusammen mit p53 Modifikationen des Chromatins induziert. ZFP36L1 gehört zu der Tristetraprolinfamilie der Zinkfingerproteine und spielt eine Rolle bei der Initiation der RNA-Degradierung, indem es RNA-abbauende Enzyme rekrutiert. Beide Proteine modifizieren die transaktivierenden Eigenschaften von HNF1 β . Ihre Interaktion mit HNF1 β ist jedoch noch nicht näher charakterisiert.

Die Untersuchungen im Mausembryo zeigen, dass HNF1 β essenziell ist für die normale Entwicklung des Säuger-Metanephros. Wie aus der vorliegenden Arbeit hervorgeht, hat HNF1 β auch eine funktionelle Bedeutung in der Entwicklung des *Xenopus*-Pronephros.

4.3 Fehlbildung des Pronephros durch P328L329

Die HNF1 β -Mutante P328L329 scheint im *Xenopus*-Embryo, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der transienten Transfektionen, ein biologisch aktiver Transkriptionsfaktor zu sein, denn die Injektion von P328L329-mRNA induzierte im frühen *Xenopus*-Embryo die Transkription des endogenen HNF1 α -Gens (Abb. 12). Da das *Xenopus*-HNF1 α -Gen in seiner regulatorischen Region zwei nah benachbarte HNF1-Erkennungssequenzen aufweist (Abb. 10), die zur Aktivität injizierter HNF1 α -Promotokonstrukte beitragen (Pogge v. Strandmann et al., 1997), ist zu vermuten, dass das exogen eingeführte P328L329 an die beiden HNF1-Erkennungssequenzen bindet und so direkt die Transkription von HNF1 α stimuliert. Insofern war es kein völlig

unerwartetes Ergebnis, dass auch die Überexpression von P328L329 zu einer Reduktion der Tubuli und des Ductus sowie in einigen Fällen zu einem vollständigen Verlust der beiden Pronephroskomponenten führte (Abb.13, 14 und 15). Im Vergleich zum HNF1 β -Wildtyp induzierte die Mutante aber fast doppelt so häufig eine Pronephrosfehlbildung (in 96% der Fälle, Tab.1). Zudem zeigten sich kurze tubuläre Strukturen mit deutlich größerem Durchmesser als die regulären Tubuli oder zystenähnliche Strukturen, die mit dem Ductus verbunden waren (Abb. 14). Diese erinnern an die Nierenzysten, die bei heterozygoten Trägern der P328L329dsdelCCTCT-Mutation festgestellt wurden (Bingham et al., 2000). Der HNF1 β -Wildtyp und die Mutante unterscheiden sich somit hinsichtlich ihres morphogenetischen Potentials. Der stärkere nephrogene Effekt der Mutante könnte dabei die in transienten Transfektionen beobachtete Gain-of-function-Wirkung widerspiegeln, die sich bei hohen Konzentrationen von P328L329 zeigte (Abb. 6 und 7).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Überexpressionsstudien zeigen, dass der *Xenopus*-Pronephros ein sehr geeignetes Modellsystem ist, sowohl um die Funktion des HNF1 β -Wildtyps in der Nephrogenese zu untersuchen, als auch zur Klärung des molekularen Mechanismus, der der P328L329 assoziierten Nierenfehlbildung zugrunde liegen könnte.

In nachfolgenden Arbeiten wurde dieser Versuchsansatz genutzt, um das morphogenetische Potential natürlich vorkommender HNF1 β -Mutanten zu charakterisieren. Es wurden insgesamt acht weitere HNF1 β -Mutationen untersucht, die beim Menschen mit verschiedenen Nierendefekten assoziiert sind, darunter Oligomeganephronie, hypoplastische glomerulozystische Nierenerkrankung und zystische Nierendysplasie (Bohn et al., 2003). Alle untersuchten HNF1 β -Mutanten führten zu einer Fehlbildung des Pronephros. Es ließen sich zwei Gruppen unterscheiden: HNF1 β -Mutanten, die wie die P328L329-Mutante zu einer Reduktion der Tubuli und des Ductus sowie zystenähnliche Strukturen führten (Wild et al., 2000; Bohn et al., 2003). Zum anderen HNF1 β -Mutanten mit einem vergrößerten Pronephros, der auf einer Verlängerung der Tubuli und des anterioren Bereichs des Ductus beruhte (Bohn et al., 2003). Die *Xenopus*-Daten zeigen, dass es sich um qualitativ unterschiedliche Mutanten handelt. Desweiteren wurde festgestellt, dass es keine eindeutige Korrelation zwischen den molekularbiologischen Eigenschaften wie DNA-Bindung und Transaktivierungspotential der HNF1 β -Mutanten und dem Pronephrosphänotyp in *Xenopus* gibt (Bohn et al., 2003; Wu et al., 2004).

In den ersten Publikationen wurden vorwiegend Nonsense- und Frameshift-Mutationen des HNF1 β -Gens beschrieben, die zur Ausbildung vorzeitiger Stopcodons führen und damit zu einer Verkürzung des HNF1 β -Proteins (zusammengefasst bei Ryffel, 2001). Die im *Xenopus*-Embryo analysierten humanen HNF1 β -Mutanten reflektieren daher dieses Mutationsspektrum. Von den

insgesamt neun untersuchten HNF1 β -Mutationen kodieren sieben für unterschiedlich stark verkürzte HNF1 β -Proteine.

Die Expression der verkürzten HNF1 β -Proteine könnte durch einen als Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD) bezeichneten Kontrollmechanismus limitiert sein. NMD detektiert und degradiert Transkripte mit vorzeitigen Stopcodons und schützt so die Zelle vor mutierten Proteinen (Harris et al., 2005). Dieser Mechanismus spielt bei den Überexpressionsstudien in *Xenopus* keine Rolle, da die injizierte mRNA keine Introns aufweist. Harris et al. (2005) untersuchten bei sechs natürlich vorkommenden HNF1 β -Mutationen, inwieweit diese NMD-sensitiv sind. Die Untersuchungen wurden unter anderem an Nierentubuluszellen, die aus dem Urin von Mutationsträgern gewonnen wurden, durchgeführt. Unter den untersuchten HNF1 β -Mutationen befand sich auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchte P328L329-Mutation sowie die Mutationen P159fsdelT und Q243fsdelC, die ebenfalls im *Xenopus*-Embryo überexprimiert wurden (Bohn et al., 2003). Eine Haploinsuffizienz lag in keinem der Fälle vor, denn es ließen sich neben den Wildtyptranskripten auch mutierte Transkripte nachweisen. Zwei Mutationen waren sogar von NMD nicht betroffen, darunter die P159fsdelT-Mutante, die in *Xenopus* zu einer Vergrößerung des Pronephros führte. Die Transkriptmengen der übrigen vier untersuchten Mutanten waren im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlich stark reduziert, im Falle der P328L329-Mutation um 78% (Harris et al., 2005). Inwieweit auch geringe Mengen an mutiertem HNF1 β -Protein bei der Entstehung des Nierendefekts eine Rolle spielen, ist noch unklar. Es ist jedoch vorstellbar, dass dies bei einem so komplexen Vorgang wie der Nephrogenese durchaus der Fall sein könnte.

Wie neuere Studien zeigen, sind bei Kindern heterozygote Deletionen des HNF1 β -Gens, die zu Haploinsuffizienz führen, die häufigste Veränderung des HNF1 β -Gens. Ulinski et al. (2006) untersuchten 80 europäische Kinder mit einem Durchschnittsalter von 0,2 Jahren, die Nierenstrukturanomalien aufwiesen, jedoch keine anderen bekannten genetischen Erkrankungen. Bei 33% der Kinder wurde eine heterozygote Veränderung des HNF1 β -Gens nachgewiesen, 64% davon waren Deletionen des ganzen HNF1 β -Gens. In der Studie von Nakayama et al. (2010) wurden 50 japanische Kinder mit einem Durchschnittsalter von 10,4 Jahren und Nierenstrukturanomalien untersucht. Hier hatten 10% der Kinder eine heterozygote HNF1 β -Genveränderung. Drei der fünf betroffenen Kinder wiesen eine vollständige Deletion des HNF1 β -Gens auf. Wie Nakayama et al. herausfanden, ist nicht nur das HNF1 β -Gen deletiert, sondern auch 14 benachbarte Gene, darunter LIM1 (LHX1), das für einen Transkriptionsfaktor kodiert, der eine wichtige Rolle in der Nephrogenese spielt (Shawlot und Behringer, 1995). Ulinski et al. erwähnen zwar keine zusätzlichen Gendeletionen, aufgrund der Größe der deletierten Region (1,2

Megabasen) ist dies jedoch zu vermuten. Interessanterweise wurden keine Unterschiede in der Nierenfunktion und im Schweregrad der morphologischen Veränderungen zwischen Patienten mit einer Deletion des HNF1 β -Gens und denjenigen mit Punktmutationen festgestellt (Ulinski et al., 2006).

4.4 Die Bedeutung von HNF1 β in der Entwicklung von Hinterhirn, Ohr und Auge

Die Überexpression von HNF1 β (Abb. 20) und P328L329 führte bei 23% bzw. 5% der injizierten *Xenopus*-Embryonen (Tab. 3) zu einer Fehlbildung des Gehirns. Der beobachtete Phänotyp, eine dorsale Wölbung des Gehirns, korreliert mit dem Expressionsmuster von HNF1 β . HNF1 β -Transkripte wurden von Demartis et al. (1994) mittels radioaktiver In-situ-Hybridisierung zu Beginn der Neurulation (Stadium 12) im präsumtiven Neuroektoderm nachgewiesen, im mittleren Neurulastadium (Stadium 16) dann in der ganzen Neuralplatte. Dabei zeigte sich eine scharfe anteriore Expressionsgrenze in der präsumtiven Rhombencephalonregion. Nach dem Schließen des Neuralrohrs (Stadium 23) war eine HNF1 β -Expression nur noch in der Deckplatte des Neuralrohrs nachzuweisen. Die Expression von HNF1 β ist im neuralen Gewebe transient, im Schwanzknospenembryo (Stadium 29) ließen sich keine Transkripte mehr detektieren (Demartis et al., 1994). Die in *Xenopus* beobachteten morphologischen Veränderungen des Gehirns weisen auf eine Funktion von HNF1 β in der Gehirnentwicklung hin. Aufgrund seines räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters könnte HNF1 β in der frühen Entwicklung des Rhombencephalons eine Rolle spielen.

In der frühen Embryonalentwicklung wird das Hinterhirn (Rhombencephalon) transient entlang der anterioposterioren Achse in sieben oder acht Segmente (Rhombomere) unterteilt, die sich zuerst in der Expression molekularer Marker und später auch morphologisch unterscheiden (Trainor und Krumlauf, 2001). Die detaillierte Untersuchung der neuroektodermalen Expression von HNF1 β im Zebrafisch, Huhn und in der Maus zeigte, dass die anteriore Expressionsgrenze an der prospektiven Grenze zwischen dem Rhombomer 4 und 5 liegt (Sun und Hopkins, 2001; Aragon et al., 2005; Sirbu et al., 2005). Aufgrund des evolutionär konservierten Expressionsmusters kann eine solche anteriore Grenze auch für *Xenopus* angenommen werden. Die Analyse von HNF1 β -mutierten Zebrafischembryonen ergab, dass HNF1 β eine bedeutende Rolle in der Spezifikation des caudalen Hinterhirns spielt. In den Rhombomeren 5 und 6 aktiviert HNF1 β zusammen mit FGF-Signalen aus dem Rhombomer 4 die Expression von *val* (*valentino/mafb/Kreisler*) und im Rhombomer 5 die Expression von *krox20*. Zusätzlich hemmt HNF1 β unabhängig von FGF-Signalen die Expression von *hoxb1a*, wodurch dessen Expression auf das Rhombomer 4 begrenzt wird (Wiellette und Sive,

2003; Hernandez et al., 2004). Im Hühnerembryo wurde eine ähnliche Funktion von HNF1 β beschrieben (Aragon et al., 2005) und im Mausembryo wirkt HNF1 β ebenfalls als Hoxb1-Repressor (Sirbu et al., 2005).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete morphologische Veränderung des Gehirns in HNF1 β - und P328L329-injizierten *Xenopus*-Larven könnte auf eine Störung der Spezifikation des Hinterhirns beruhen. Durch eine Analyse der Expression von *hoxb1*, *krox20* und *val* mittels In-situ-Hybridisierung ließe sich dies relativ einfach klären. Würde sich der molekulare Phänotyp von *Xenopus* und Zebrafisch unterscheiden (siehe oben), so wäre dies ein Hinweis auf eine bislang noch nicht identifizierte Funktion von HNF1 β in der neuralen Entwicklung.

HNF1 β - oder P328L329-injizierte *Xenopus*-Larven (Abb. 21) zeigten auf der manipulierten Seite ein kleineres und weniger strukturiertes Ohrvesikel. Ein ähnlicher morphologischer Phänotyp wurde in HNF1 β -mutierten Zebrafischembryonen beschrieben (Sun und Hopkins, 2001; Lecaudey et al., 2007). Das Vertebratenohr entwickelt sich aus einer ektodermalen Plakode in unmittelbarer Nähe der Rhombomeren 4 bis 6 des Hinterhirns. Aus der Plakode geht später das Ohrvesikel hervor. Wie Lecaudey et al. zeigen, ist in HNF1 β -mutierten Zebrafischembryonen die Musterbildung im Ohrvesikel verändert. Da HNF1 β in dem sich entwickeltem Innenohr nicht exprimiert ist, wurde die Expression von Signalmolekülen im Hinterhirn untersucht. Es zeigte sich, dass in den Rhombomeren 5 und 6, in denen normalerweise HNF1 β vorliegt, die Expression der Signalmoleküle *wnt1* und *wnt3a* stark reduziert ist. Wie die Autoren schließen, könnte das caudale Hinterhirn über Wnt-Signale die Musterbildung im Ohr regulieren.

43% der HNF1 β - und 28% der P328L329-injizierten Larven wiesen auf der manipulierten Seite ein kleineres Auge auf (Abb. 19-21, Tab. 3). Ein solcher Phänotyp wurde in HNF1 β -mutierten Zebrafischembryonen nicht beschrieben. In dem sich entwickelnden Auge ist eine Expression von HNF1 β unbekannt. Aufgrund der relativ großen räumlichen Trennung der endogenen HNF1 β -Expression zu dem sich entwickelnden Auge scheint es unwahrscheinlich, dass HNF1 β hier eine Funktion hat. Die beobachtete Augenanomalie könnte auf einer ektopischen Expression der injizierten mRNAs im vorderen Bereich des Kopfes beruhen. Durch Injektion von spezifischen Morpholino-Oligonukleotiden zum Knock-down der endogenen HNF1 β -Expression in *Xenopus*-Embryonen könnte überprüft werden, ob es sich hier tatsächlich um einen Artefakt handelt.

In transgenen *Xenopus*-Larven, die die HNF1 β -Mutante P328L329 konstitutiv exprimieren, wurden Fehlbildungen des Gehirns, Ohrs und Auges nicht beschrieben (Roose et al., 2009). Die transgenen Larven entwickelten aufgrund der beidseitigen Pronephrosfehlbildung starke Ödeme,

wodurch sie zum Teil stark deformiert wurden. Morphologische Veränderungen des Gehirns und der Ohrkapsel dürften in solchen Larven ohne Hilfsmittel nur schwer zu erkennen sein. Möglicherweise waren die Augen der transgenen Larven kleiner, dies wurde aber nicht registriert, da beide Augen betroffen waren. Gegen Artefakte hinsichtlich der Gehirn- und Ohrfehlbildung in HNF1 β - und P328L329-injizierten Larven sprechen zudem die Ergebnisse der Untersuchungen an HNF1 β -mutierten Zebrafischembryonen (siehe oben).

Eine mögliche Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse für den Menschen zeigt eine kürzlich erschienene Publikation von Adalat et al. (2010), in der eine Familie mit einer heterozygoten HNF1 β -Mutation im Spleißsignal des Introns 2 beschrieben wird. Zwei betroffene Kinder mit Nierenanomalien weisen zusätzlich beidseitig einen milden sensorisch-neuralen Hördefekt auf.

4.5 Die Bedeutung von HNF1 β in der Entwicklung der Neuralleiste

Bei 70% der HNF1 β - und bei 43% der P328L329-injizierten Larven führte die Überexpression zu einer Fehlbildung des Kopfskeletts (Tab. 3). Davon betroffen waren branchiale und craniofaciale Skelettelemente (Abb. 19). Der branchiale Phänotyp beinhaltet eine reduzierte Kiemenregion mit Fehlbildung der Kiemenbögen und der craniofaciale eine Reduktion der rostralen Kopfregion mit Fehlbildung bzw. Verlust von rostralen Skelettelementen. Gemeinsam ist den betroffenen Strukturen, dass sie Derivate der Neuralleiste sind. Diese entsteht im Grenzbereich zwischen Neuralplatte und Ektoderm. Nach Induktion und Ablösung aus dem Epithelverband wandern die Neuralleistenzellen auf vorgegeben Wegen in verschiedene Regionen des Embryos, wo sie sich in eine Vielzahl von Zelltypen differenzieren (Kuriyama und Mayer, 2008).

Bekannt ist, dass die Neuralleiste durch Signale aus der umgebenden Epidermis, der angrenzenden Neuralplatte und dem darunterliegenden Mesoderm induziert wird. Eine Reihe verschiedener Signale werden in diesen Geweben produziert und spezifizieren die Neuralleiste entlang der dorsoventralen und der anterioposterioren Achse des Embryos. Die Integration der Signale aktiviert wiederum eine Genkaskade in der ganzen Neuralfalte, die sich später auf die Neuralleiste beschränkt (Kuriyama und Mayer, 2008). HNF1 β könnte nicht nur bei der Spezifikation des posterioren Bereichs des Hinterhirns und des Ohrvesikels (siehe 4.4) eine Rolle spielen, sondern auch bei der Spezifikation der angrenzenden Neuralleistensegmente. HNF1 β ist in den prospektiven Rhombomeren 5-8 des Hinterhirns exprimiert (Sun und Hopkins, 2001). In diesem Bereich entsteht das branchiale Neuralleistensegment. Die Abkömmlinge des Segments bilden das Skelett und Mesenchym der Kiemen (Sadaghiani und Thiebaud, 1987). Hier besteht möglicher-

weise ein direkter Bezug zu den in HNF1 β - und P328L329-injizierten Larven beobachteten Fehlbildungen des Kiemenskeletts (Abb. 19). Es waren jedoch auch Skelettelemente fehlgebildet, die von weiter rostral gelegenen Neuralleistensegmenten gebildet werden (craniofacialer Phänotyp). Beobachtet wurde unter anderem eine Fehlbildung des Meckel'schen Knorpels, aus dem später der Unterkiefer hervorgeht. Zur Bildung dieser Struktur tragen Neuralleistenzellen aus dem mandibularen Neuralleistensegment bei, das an die anteriore Hinterhirnregion und das Mesencephalon (Mittelhirn) angrenzt (Sadaghiani und Thiebaud, 1987). In beiden Gehirnregionen ist HNF1 β nicht exprimiert.

In HNF1 β -mutierten und HNF1 β -mRNA-injizierten Zebrafischembryonen wurde eine Transformation der molekularen Identität der Rhombomere nachgewiesen, die der endogenen Expressionsdomänen von HNF1 β benachbart sind (Sun und Hopkins, 2001). Sehr wahrscheinlich liegt ein solcher Musterbildungsdefekt auch in den HNF1 β - und P328L329-injizierten *Xenopus*-Embryonen vor. Dies könnte die Ursache sein für die Fehlbildung von Neuralleistenderivaten, die von Segmenten abstammen, die rostral der Expressionsdomäne von HNF1 β liegen. Andererseits könnte auch eine ektopische Expression der injizierten mRNAs einen Musterbildungsdefekt hervorrufen.

Desweiteren war bei HNF1 β - und P328L329-injizierten *Xenopus*-Larven die Zahl der dunkelpigmentierten Melanozyten im Peritoneum der manipulierten Seite stark reduziert (Abb. 18, Tab. 2). Die Pigmentierungsanomalie trat bei P328L329-injizierten Larven (50%) deutlich häufiger auf als bei HNF1 β -injizierten (8%). Interessanterweise zeigten 39% der P328L329-injizierten Larven eine punktförmige ektopische Pigmentierung, die bei HNF1 β -injizierten Larven nicht zu beobachten war. Die ektopische und die reduzierte Pigmentierung traten oft zusammen in einer Larve auf, konnten aber auch getrennt beobachtet werden (Abb. 18). Demnach scheinen sie voneinander unabhängige Störungen der normalen Pigmentierung darzustellen. Pigmentzellen sind ebenfalls Abkömmlinge der Neuralleiste, hier aber hauptsächlich der des Stammes (Sadaghiani und Thiebaud, 1987). Im *Xenopus*-Embryo wurde eine transiente HNF1 β -Expression im dorsalen Bereich der Neuralröhre, der Deckplatte, beschrieben (Demartis et al., 1994). Da die Neuralleiste des Rumpfes sich nahe der Deckplatte befindet, könnte es sich hier durchaus auch um HNF1 β -exprimierende Neuralleistenzellen handeln. Im Mausembryo wurde eine solche Expressionsdomäne beschrieben (Coffinier et al., 1999; Barbacci et al., 1999). Eine funktionelle Bedeutung von HNF1 β in der Entwicklung der Stammneuralleiste erscheint damit wahrscheinlich.

Die Überexpressionsstudien im *Xenopus*-Embryo weisen auf eine mögliche Funktion von HNF1 β in der Entwicklung der Neuralleiste hin. Weitere Untersuchungen sind jedoch erforderlich, um dies

eindeutig zu belegen. Die Injektion von Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden zum spezifischen Knock-down der Expression von HNF1 β im *Xenopus*-Embryo scheint hier als Ergänzung zur Injektion von HNF1 β -mRNA besonders sinnvoll zu sein. Dies würde die Interpretation der Phänotypen, die durch Überexpression und/oder ektopischer Expression von HNF1 β hervorgerufen werden, erleichtern. Eine mögliche Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse für den Menschen zeigt die postmortem Untersuchung eines 27-Wochen alten Fötus mit einer heterozygoten Frameshift-Mutation im HNF1 β -Gen (Haumaitre et al., 2006). Der Fötus wies neben zystischen Nieren auch leichte craniofaciale Anomalien auf. Es wurde eine Retrognathie und ein Hypertelorismus festgestellt. Unter Retrognathie versteht man eine Rückverlagerung des Kiefers im Verhältnis zur Schädelbasis und unter Hypertelorismus einen zu großen Abstand zwischen den Augenhöhlen. Desweiteren berichten Moreno-De-Luca et al. (2010) von milden facialen Phänotypen bei 9 von 18 Patienten, die eine heterozygote Deletion des HNF1 β -Gens aufweisen. Da aber auch benachbarte Gene deletiert sind, könnte die Haploinsuffizienz eines oder mehrerer dieser Gene den facialen Phänotyp hervorrufen. Die Untersuchung einer möglichen Funktion von HNF1 β in der Entwicklung der cranialen Neuralleiste könnte zur Klärung dieser Frage beitragen. Hierzu würde sich der *Xenopus*-Embryo hervorragend eignen.

4.6 Unterschiede der Proteinfunktionen von HNF1 α und HNF1 β

Die Gene, die für HNF1 α und HNF1 β kodieren, entstanden sehr wahrscheinlich durch Verdoppelung eines ancestralen Gens zu Beginn der Vertebratenevolution (Cereghini, 1996). Beide Gene zeigen ein überlappendes, jedoch nicht identisches Expressionsmuster. In der Embryonalentwicklung wird HNF1 β deutlich früher und auch weiträumiger exprimiert als HNF1 α . Es fand offensichtlich eine Veränderung der Genfunktion durch Evolution cis-regulatorischer Sequenzen statt. Die Genfunktion scheint aber auch hinsichtlich der Proteinfunktion zu differieren. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Überexpressionsstudien in *Xenopus*-Embryonen belegen, dass die strukturell nah verwandten Proteine unterschiedliche intrinsische Eigenschaften aufweisen: Nur die Überexpression von HNF1 β , nicht jedoch von HNF1 α , führte zu Fehlbildungen von Pronephros, Gehirn, Auge, Ohr und verschiedenen Neuralleistenderivaten. Funktionelle Unterschiede zwischen den beiden Proteinen zeigten sich auch in transienten Transfektionen. In HeLa-Zellen aktivierte HNF1 α ein Reportergen, dem ein synthetischer Promotor (Abb. 6), der Albuminpromotor (Abb. 7) oder der HNF1 α -Promotor (Abb.10) vorgeschaltet ist, stärker als HNF1 β . Ein solcher Unterschied im Transaktivierungspotential wurde in der Literatur auch für andere Promotoren und Zelllinien beschrieben (z.B. Hu und Perlmutter, 2002; Gu et al., 2004).

Es stellt sich die Frage, welcher Sequenzbereich für die unterschiedliche Wirkung der HNF1-Proteine im *Xenopus*-Embryo verantwortlich sein könnte. Einen Hinweis gibt die Proteinstruktur der HNF1 β -Mutante P328L329, die in *Xenopus* das gleiche Fehlbildungsspektrum wie der Wildtyp induziert (Tab. 1-3). In der Mutante ist die C-terminale Transaktivierungsdomäne weitgehend deletiert, von 244 Aminosäuren bleiben lediglich 14 erhalten (Abb.3). Daher scheint diese Proteinregion, obwohl sie zwischen HNF1 α und HNF1 β am geringsten konserviert ist (Abb.1), keine oder nur eine geringe Rolle zu spielen. Der für die unterschiedliche Funktion verantwortliche Proteinbereich müsste sich demnach in der N-terminalen Hälfte der Proteine befinden. Hier unterscheiden sich die beiden Proteine vor allem durch eine Sequenz von 26 Aminosäuren, die zwischen der POU_S- und POU_H-Domäne liegt. Diese ist HNF1 β -spezifisch, sie kommt in keiner der HNF1 α -Isoformen vor (Bach et al., 1993). Die unterschiedliche Funktion von HNF1 α und HNF1 β könnte somit auf diesem 26-Aminosäuresegment beruhen und/oder anderen strukturellen Unterschieden im N-terminalen Bereich der Proteine.

Wu et al. (2004) gingen dieser Frage nach. Sie injizierten mRNAs in *Xenopus*-Embryonen, die für verschiedene HNF1 α -HNF1 β -Hybridproteine kodieren. Es stellte sich heraus, dass die N-terminale Dimerisierungsdomäne, das HNF1 β -spezifische Aminosäuresegment und die POU_H-Domäne zum nephrogenen Potential von HNF1 β beitragen. Wird eine dieser Regionen in einem HNF1 α -Konstrukt, dem die C-terminale Transaktivierungsdomäne fehlt, gegen die entsprechende HNF1 β -Sequenz ausgetauscht, so ist das resultierende Hybridprotein in der Lage die Pronephrogenese in *Xenopus* zu beeinflussen (Wu et al., 2004). Inwieweit diese Regionen auch bei der Induktion der anderen Fehlbildungen, wie die des Ohrs oder des Gehirns, eine Rolle spielen, ist noch unklar.

In der Maus führte die Inaktivierung von HNF1 α und HNF1 β ebenfalls zu unterschiedlichen Phänotypen. HNF1 α -defiziente Mäuse werden normal geboren, leiden aber an einer schweren Funktionsstörung der Nieren, der Leber und des Pankreas. (Pontoglio et al., 1996). Die Mäuse entwickeln ein Fanconi-ähnliches Syndrom aufgrund eines Defekts in der Reabsorption im proximalen Nierentubulus, wodurch es zur Ausscheidung von Glukose, Phosphat und Arginin kommt (Pontoglio et al., 1996). Die Leber ist stark vergrößert und wichtige Funktionen dieses Organs wie der Gallensäuren- und Cholesterolfstoffwechsel sind gestört (Shih et al., 2001). Im Pankreas zeigte sich ein Insulinsekretionsdefekt (Pontoglio, 2000). Strukturelle Veränderungen wurden in den betroffenen Organen nicht festgestellt. HNF1 β -defiziente Embryonen, die durch tetraploide Aggregation (siehe 4.2) generiert wurden, entwickeln keinen Pankreas (Haumaitre et al., 2005). Das selektive Ausschalten des HNF1 β -Gens in der Leberentwicklung führt zu einer Fehlbildung der Gallenblase und der Gallengänge (Coffinier et al., 2002). Die renale Inaktivierung

führt zur Ausbildung von Nierenzysten (Gresh et al., 2004; siehe auch 4.3 und 4.4). Auch die klinischen Phänotypen, die mit Mutationen im HNF1 α und HNF1 β -Gen assoziiert sind, differieren. HNF1 β -Mutationen sind beim Menschen mit einem breiten klinischen Spektrum assoziiert: MODY5, Pankreasatrophie, exokrine Funktionsstörung des Pankreas, Leberfunktionsstörung, Anomalien des Genitaltrakts, Gicht und Hyperurikämie sowie verschiedene Nierenanomalien, darunter zystische Nierendysplasie, Hypoplasie, Dysplasie, hypoplastische glomerulozystische Nierenerkrankung, Oligomeganephronie, hyperurikämische Nephropathie, Hufeisenniere und Nierenagenesie (zusammengefasst bei Edghill et al., 2006; Thomas et al., 2008). Desweiteren können das in einzelnen Fällen beschriebene eingeschränkte Hörvermögen (Adalat et al., 2006) oder milde craniofaciale Anomalien (Haumaitre et al., 2006) auftreten. Heterozygote Mutationen im HNF1 α -Gen sind beim Menschen mit MODY3 und einigen Fällen mit einer Störung der renalen Reabsorption von Glukose assoziiert (Pontoglio et al., 2000). Im Gegensatz zu HNF1 β verursachen heterozygote Mutationen im HNF1 α -Gen keine Organfehlbildungen.

Die Überexpressionsstudien im *Xenopus*-Embryo zeigen, dass HNF1 α und HNF1 β sich in ihren intrinsischen Eigenschaften unterscheiden. Die unterschiedlichen klinischen Phänotypen, die mit Mutationen in diesen beiden Genen assoziiert sind, könnten teilweise auf den spezifischen Proteineigenschaften von HNF1 α und HNF1 β basieren.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor Hepatocyte Nuclear Faktor (HNF1)1 β eine funktionelle Bedeutung in der Entwicklung der embryonalen Niere von *Xenopus laevis* hat. Die Überexpression von HNF1 β im *Xenopus*-Embryo beeinträchtigte die Morphogenese der Pronephros-Tubuli und des Ductus, in beiden Strukturen ist das endogene HNF1 β exprimiert. Die Überexpression der humanen HNF1 β -Mutante P328L329fsdelCCTCT (P328L329) führte zu ähnlichen Fehlbildungen des Pronephros, jedoch zweimal so häufig wie der HNF1 β -Wildtyp. Dieses Ergebnis könnte das verstärkte Transaktivierungspotential widerspiegeln, das die Mutante in transienten Transfektionen bei hohen Konzentrationen zeigt. Der Pronephros-Phänotyp sowie das veränderte Transaktivierungspotential sind gute Hinweise auf einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Mutation und der assoziierten zystischen Nierenfehlbildung bei einem 17 Wochen alten Fötus.

Die Überexpression von HNF1 β und P328L329 führten auch zu morphologischen Veränderungen von Gehirn, Ohrvesikel, craniofacialen und branchialen Kopfskelettelementen sowie zu kleineren Augen und reduzierter Pigmentierung des Peritoneums. Die Fehlbildung des Gehirns korreliert mit dem Expressionsmuster von HNF1 β . HNF1 β ist in der Neuralplatte und später in dem sich bildenden Neuralrohr exprimiert und zwar mit einer anterioren Grenze im caudalen Hinterhirn. Eine funktionelle Bedeutung von HNF1 β in der molekularen Musterbildung des Gehirns und des Ohrvesikel wurde kürzlich in der Literatur beschrieben. Das craniofaciale und branchiale Kopfskelett und die Pigmentzellen sind Derivate der Neuralleiste. Die Neuralleiste entsteht im Grenzbereich zwischen Neuralplatte und Epidermis. Es ist daher denkbar, dass HNF1 β bei der Spezifikation der Neuralleistenzellen eine funktionelle Bedeutung hat. Aufgrund der anterioren Expressionsgrenze von HNF1 β im caudalen Hinterhirn scheint es unwahrscheinlich, dass HNF1 β eine Funktion in der Entwicklung des Auges hat. Das kleinere Auge könnte stattdessen auf einer ektopischen Expression der injizierten mRNA in der rostralen Kopfregion beruhen.

Die Überexpression des nah verwandten Transkriptionsfaktors HNF1 α hatte keinerlei Auswirkungen auf die Entwicklung der Embryonen. Dies zeigt, dass HNF1 α und HNF1 β sich in ihren intrinsischen Eigenschaften unterscheiden. Die unterschiedlichen klinischen Phänotypen, die mit heterozygoten Mutationen im HNF1 α - und HNF1 β -Gen assoziiert sind, könnten daher teilweise auf den spezifischen Proteineigenschaften von HNF1 α und HNF1 β basieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Adalat, S., Bockenhauer, D., Ledermann, S.E., Hennekam, R.C., Woolf, A.S. (2010): Renal malformations associated with mutations of developmental genes: messages from the clinic. *Pediatr Nephrol* 25, 2247-2255.
2. Aragón, F., Vázquez-Echeverría, C., Ulloa, E., Reber, M., Cereghini, S., Alsina, B., Giraldez, F., Pujades, C. (2005): vHnf1 regulates specification of caudal rhombomere identity in the chick hindbrain. *Dev Dyn* 234, 567-576.
3. Bach, I., Mattei, M.G., Cereghini, S., Yaniv, M. (1991): Two members of an HNF1 homeoprotein family are expressed in human liver. *Nucleic Acids Res* 19, 3553-3559.
4. Bach, I., Yaniv, M. (1993): More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing. *EMBO J* 12, 4229-4242.
5. Barbacci, E., Reber, M., Ott, M.-O., Breillat, C. Huetz, F., Cereghini, S. (1999): Variant Hepatocyte Nuclear Factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development* 126, 4795-4805.
6. Bartkowski, S., Zapp, D., Weber, H., Eberle, G., Zoidl, C., Senkel, S., Klein-Hitpass, L., Ryffel, G.U. (1993): Developmental regulation and tissue distribution of the liver transcription factor LFB1 (HNF1) in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 13, 421-431.
7. Beards, F., Frayling, T., Bulman, M., Horikawa, Y., Allen, L., Appleton, M., Bell, G.I., Ellard, S., Hattersley, A.T. (1998): Mutations in Hepatocyte Nuclear Factor 1 β are not a common cause of Maturity-onset Diabetes of the Young in the U.K. *Diabetes* 47, 1152-1154.
8. Bingham, C., Ellard, S., Allen, L., Bulman, M., Shepher, M., Frayling, T., Berry P.J., Clark P.M., Lindner T., Bell, G.I., Ryffel, G.U., Nicholls, A.J., Hattersley, A.T.: Abnormal nephron development associated with a frameshift mutation in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1 beta. *Kidney Int* 57, 898-907.
9. Bohn, S., Thomas, H., Gülüzar, T., Ellard, S., Bingham, C., Hattersley, A.T., Ryffel, G.U. (2003): Distinct molecular and morphogenetic properties of mutations in the human HNF1 β Gene that lead to defective kidney development. *J Am Soc Nephrol* 14, 2033-2041.

10. Brändli, A.W. (1999): Towards a molecular anatomy of the *Xenopus* pronephric kidney. *Int J Dev Biol* 43, 381-395.
11. Carroll, T., Wallingford, J., Seufert, D., Vize, P.D. (1999): Molecular regulation of pronephric development. *Curr Top Dev Biol* 44, 67-100.
12. Cereghini, S. (1996): Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J* 10, 267-282.
13. Cereghini, S., Ott, M.-O., Power, S., Maury, M. (1992): Expression patterns of vHNF1 and HNF1 homeoproteins in early postimplantation embryos suggest distinct and sequential developmental roles. *Development* 116, 783-797.
14. Coffinier, C., Gresh, L., Fiette, L., Tronche, F., Schütz, G., Babinet, C., Pontoglio, M., Yaniv, m., Barra, J. (2002): Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1 β . *Development* 129, 1829-1838.
15. Coffinier, C., Thépot, D., Babinet, C., Yaniv, M., Barra, J. (1999): Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1 β in visceral endoderm differentiation. *Development* 126, 4785-4794.
16. Demartis, A., Maffei, M., Vignali, R., Barsacchi, G., De Simone, V. (1994): Cloning and developmental expression of LFB3/HNF1 β transcription factor in *Xenopus laevis*. *Mech Dev* 47, 19-28.
17. Deryckere, F., Byrnes, L., Wagner, A., McMorrow, T., Gannon, F. (1995): Salmon HNF1: cDNA sequence, evolution, tissue specificity and binding to the salmon serum albumin promoter. *J Mol Biol* 247, 1-10.
18. Drewes, T., Clairmont, A., Klein-Hitpass, L., Ryffel, G.U. (1994): Estrogen-inducible derivatives of hepatocyte nuclear factor-4, hepatocyte nuclear factor-3 and liver factor B1 are differently affected by pure and partial antiestrogens. *Eur J Biochem* 225 (1), 441-448.
19. Drewes, T., Senkel, S., Holewa, B., Ryffel, G.U. (1996): Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol Cell Biol* 16, 925-931.
20. Drewes, C., Senkel, S., Ryffel, G.U. (2011): The nephrogenic potential of the transcription factors *osr1*, *osr2*, *hnf1b*, *lhx1* and *pax8* assessed in *Xenopus* animal caps. *BMC Developmental Biologie online*, www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-213x-11-5.pdf

21. Dudziak, K., Mottalebi, N., Senkel, S., Edghill, E., Rosengarten, S., Roose, M., Bingham, C., Ellard, S., Ryffel, G.U. (2008): Transcription factor HNF1 β and novel partners affect nephrogenesis. *Kidney Int* 74, 201-217.
22. Edghill, E.L., Bingham, C., Ellard, S., Hattersley, A.T. (2006): Mutations in hepatocyte nuclear factor-1 β and their related phenotypes. *J Med Genet* 43, 84-90.
23. Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., Bishop, J.M. (1985): Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5, 3610-3616.
24. Finney, M. (1990): The homeodomain of the transcription factor LF-B1 has a 21 amino acid loop between helix 2 and helix 3. *Cell* 60, 5-6.
25. Fischer, E., Legue E., Doyen, A., Nato, F., Nicolas, J.F., Torres, V., Yaniv, M., Pontoglio, M. (2006): Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nat Genet* 38 (1), 21-23.
26. Fischer, E., Pontoglio, M. (2008): HNF1 β and defective nephrogenesis: a role for interacting partners? *Kidney Int* 74, 145-147.
27. Frain, M., Swart, G., Monaci, P., Nicosia, A., Stampfli, S., Frank, R., Cortese, R. (1989): The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain. *Cell* 59, 145-157.
28. Froguel, P., Velho, G. (1999): Molecular Genetics of Maturity-onset Diabetes of the Young. *TEM* 10 (4), 142-146.
29. Gehring, W.J., Affolter, M., Bürglin, T. (1994): Homeodomain Proteins. *Annu Rev Biochem* 63, 487-526.
30. Gong, Y., Ma, Z., Patel, V., Fischer, E., Hiesberger, T., Pontoglio, M., Igarashi, P. (2009): HNF-1 β Regulates Transcription of the PKD Modifier Gene Kif12. *J Am Soc Nephrol* 20, 41-47.
31. Gresh, L., Fischer, E., Reimann, A., Tanguy, M., Garbay, S., Shao, X., Hiesberger, T., Fiette, L., Igarashi, P., Yaniv, M., Pontoglio, M. (2004): A transcriptional network in polycystic kidney disease. *EMBO J* 23, 1-12.
32. Harland, R.M. (1991): In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol* 36, 685-695.
33. Harries, L.W., Bingham, C., Bellanne-Chantelot, C., Hattersley, A.T., Ellard, S. (2005): The position of premature termination codons in the hepatocyte nuclear factor – 1 beta

- gene determines susceptibility to nonsense-mediated decay. Hum Genet online, DOI 10.1007/s00439-005-0023-y.
34. Hattersley, A.T. (1998): Maturity-onset Diabetes of the Young: Clinical Heterogeneity Explained by Genetic Heterogeneity. Diabet Med 15, 15-24.
 35. Haumaitre, C., Barbacci, E., Jenny, M., Ott, M.O., Gradwohl, G., Cereghini, S. (2005): Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis. PNAS 102, 1490-1495.
 36. Haumaître, C., Fabre, M., Cormier, S., Baumann, C., Delezoide, A.-L., Cereghini, S. (2006): Severe pancreas hypoplasia and multicystic renal dysplasia in two human fetuses carrying novel HNF1 β /MODY5 mutations. Hum Mol Genet 15, 2363-2375.
 37. Heasman, J. (1997): Patterning the Xenopus blastula. Development 124, 4179-4191.
 38. Hernandez, R.E., Rikhof, H.A., Bachmann, R., Moens, C.B. (2004): vhnf1 integrates global RA patterning and local FGF signals to direct posterior hindbrain development in zebrafish. Development 131, 4511-4520.
 39. Hildebrandt, F., Zhou, W. (2007): Nephronophthisis-Associated Ciliopathies. J Am Soc Nephrol 18, 1855-1871.
 40. Horikawa, Y., Iwasaki, N., Hara, M., et al. (1997): Mutation in hepatocyte nuclear factor-1beta gene (TCF2) associated with MODY. Nat Genet 17, 384-385.
 41. Hu, C., Perlmutter, D.H. (2002): Cell-specific involvement of HNF-1b in α 1-antitrypsin gene expression in human respiratory epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 282, L757-L765.
 42. Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Jaenisch, R. (1993): WTI is required for early kidney development. Cell 74, 679-691.
 43. Kuriyama, S., Mayor, R. (2008): Molecular analysis of neural crest migration. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 363, 1349-1363.
 44. Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
 45. Lazzaro, D., De Simone, V., De Magistris, L., Lehtonen, E., Cortese, R. (1992): LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development. Development 114, 469-479.

46. Lecaudey, V., Ulloa, E., Anselme, I., Stedman, A., Schneider-Maunoury, S., Pujades, C. (2007): Role of the hindbrain in patterning the otic vesicle: A study of the zebrafish *vhnf1* mutant. *Dev Biol* 303, 134-143.
47. Lemm, I., Lingott, A., Pogge v. Strandmann, E., Zoidl, C., Bulman M.P., Hattersley A.T. (1999): Loss of HNF1alpha function in human renal cell carcinoma: frequent mutations in the VHL gene but not the HNF1alpha gene. *Mol Carcinog* 24, 305-314.
48. Lokmane, L., Heliot, C., Garcia-Villalba, P., Fabré, M., Cereghini, S. (2010): vHNF1 functions in distinct regulatory circuits to control ureteric bud branching and early nephrogenesis. *Development* 137, 347-357.
49. Lynch, S.A., Wright, C. (1997): Sirenomalia, limb reduction defects, cardiovascular malformation, renal agenesis in an infant born to a diabetic mother. *Clin Dysmorphol* 6, 75-80.
50. Mironiuk, M., Kietlinska, Z., Jezierska-Kasprzyk, K., Piekosz-Orzechowska, B. (1997): A class of diabetes in mother, glycemic control in early pregnancy and occurrence of congenital malformations in newborn infants. *Clin Exp Obstet Gynecol* 24, 193-197.
51. Moreno-De-Luca, D., SGENE Consortium, Mulle, J.G., et al. (2010): Deletion 17q12 Is a Recurrent Copy Number Variant that Confers High Risk of Autism and Schizophrenia. *Am J Hum Genet* 87, 618-630.
52. Nakayama, M., Nozu, K., Goto, Y., Kamei, K., Ito, S., Sato, H., Emi, M., Nakanishi, K., Tsuchiya, S., Iijima, K. (2010): HNF1β alterations associated with congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatr Nephrol* 25, 1073-1079.
53. Nastos, A., Pogge von Strandmann, E., Weber, H., Ryffel, G.U. (1998): The embryonic expression of the tissue-specific transcription factor HNF1alpha in *Xenopus*: rapid aviation by HNF4 and delayed induction by mesoderm inducers. *Nucleic Acids Res* 26, 5602-5608.
54. Nieuwkoop, P.D., Faber, J. (1975): Normal table of *Xenopus laevis*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Publishing.
55. Nishigori, H., Yamada, S., Kohama, T., Tomura, H., Sho, K., Horikawa, Y. Bell, G.I., Takeuchi, T., Takeda, J. (1998): Frameshift Mutation, A263fsinsGG, in the Hepatocyte Nuclear Factor-1β Gene Associated With Diabetes and Renal Dysfunction. *Diabetes* 47, 1354-1355.
56. Nordeen, S.K. (1988): Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* 6, 454-458.

57. Ott, M.-O., Rey-Campos, J., Cereghini, S., Yaniv, M. (1991): vHNF1 is expressed in epithelial cells of distinct embryonic origin during development and precedes HNF1 expression. *Mech Dev* 36, 47-58.
58. Pogge von Strandmann, E., Nastos, A., Holewa, B., Senkel, S., Weber, H., Ryffel, G.U. (1997): Patterning the expression of a tissue-specific transcription factor in embryogenesis: HNF1alpha gene activation during *Xenopus* development. *Mech Dev* 64, 7-17.
59. Pontoglio, M., Barra, J., Hadchouel, M., Doyen, A., Kress, C., Bach, J.P., Babinet, C., Yaniv, M. (1996): Hepatocyte Nuclear Factor 1 Inactivation Results in Hepatic Dysfunction, Phenylketonuria and Renal Fanconi Syndrome. *Cell* 84, 575-585.
60. Pontoglio, M., Prié, D., Cheret, C., Doyen, A., Leroy, C., Froguel, P., Velho, G., Yaniv, M., Friedlander, G. (2000) : HNF1alpha controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep* 1(4), 359-365.
61. Pontoglio, M., Sreenan, S., Roe, M., Pugh, W., Ostrega, D., Doyen, A., Pick, A.J., Baldwin, A., Velho, G., Froguel, P., Levisetti, M., Bonner-Weir, S., Bell, G.I., Yaniv, M., Polonsky, K.S. (1998): Defective Insulin Secretion in Hepatocyte Nuclear Factor 1alpha-deficient Mice. *J Clin Invest* 101, 2215-2221.
62. Pontoglio, M. (2000): Hepatocyte Nuclear Factor 1, a Transcription Factor at the Crossroads of Glucose Homeostasis. *J Am Soc Nephrol* 11, S140-S143.
63. Ringeisen, F., Rey-Campos, J., Yaniv, M. (1993): The Transactivation Potential of Variant Hepatocyte Nuclear Factor 1 Is Modified by Alternative Splicing. *J Biol Chem* 268 (34), 25706-25711.
64. Roose, M., Sauert, K., Turan, G., Solomentsev, N., Werdien, D., Pramanik, K., Senkel, S., Ryffel, G.U., Waldner, C. (2009): Heat-shock inducible Cre strains to study organogenesis in transgenic *Xenopus laevis*. *Transgenic Res* online, DOI 10.1007/s11248-009-9253-4.
65. Ryffel, G.U. (2001): Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J Mol Endocrinol* 27, 11-29.
66. Ryffel, G.U. (2003): What Can a Frog Tell Us about Human Kidney Development. *Nephron Exp Nephrol* 94, e35-e43.
67. Ryffel, G.U. (2010): HNF1B (Homo sapiens). In *Transcription Factor Encyclopedia*. TFE online, <http://www.cisreg.ca/tfe>.

68. Sakamaki, H., Akazawa, S., Ishibashi, M., Izumino, K., Takino, H., Yamasaki, H., Yamaguchi, Y., Goto, S., Urata, Y., Kondo, T., Nagataki, S. (1999): Significance of Glutathione-Dependent antioxidant Systems in Diabetes-Induced Embryonic Malformations. *Diabetes* 48, 1138-1144.
69. Sadaghiani, B., Thiébaud, C.H. (1987): Neural Crest Development in the *Xenopus laevis* Embryo, Studied by Interspecific Transplantation and Scanning Electron Microscopy. *Dev Biol* 124, 91-110.
70. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning – a laboratory manual. (second edition) Cold Spring Harbour Laboratory, New York.
71. Schaefer-Graf, U.M., Buchanan, T.A., Xiang, A., Songster, G., Montoro, M., Kjos, S.L. (2000): Patterns of congenital anomalies and relationship to initial maternal fasting glucose levels in pregnancies complicated by type 2 and gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 186, 751-756.
72. Schorpp, M., Kugler, W., Wagner, U., Ryffel, G.U. (1988): Hepatocyte-specific promoter element HP1 of the *Xenopus* albumin gene interacts with transcriptional factors of mammalian hepatocytes. *J Mol Biol* 202 (2), 307-320.
73. Shawlot, W., Behringer, R.R. (1995): Requirement for *Lim1* in head-organizer function. *Nature* 374, 425-430.
74. Shih, D.Q., Bussen, M., Sehayek, E., Ananthanarayanan, M., Shneider, B.L., Suchy, F.J., Shefer, S., Bollilini, J.S., Gonzalez, F.J., Breslow, J.L., Stoffel, M. (2001): Hepatocyte nuclear factor-1a is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. *Nat Genet* 27, 375-382.
75. Sirbu, I.O., Gresh, L., Barra, J., Duyster, G. (2005): Shifting boundaries of retinoic acid activity control hindbrain segmental gene expression. *Development* 132, 2611-2622.
76. Sive, H., Graininger, R.M., Harland, R.M. (2000): Early Development of *Xenopus laevis*, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
77. Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G., McMahon, A.P. (1994): Epithelial transformation of meta-nephric mesenchyme in the developing kidney regulated by *Wnt-4*. *Nature* 372, 679-683.

78. Sun, Z., Hopkins, N. (2001): *vhnf1*, the MODY5 and familial GCKD-associated gene, regulates regional specification of the zebrafish gut, pronephros, and hindbrain. *Genes Dev* 15, 3217-3229.
79. Taira, M., Jamrich, M., Good, P., Dawid, I.B. (1992): The LIM domain-containing homeobox gene *Xlim-1* is expressed specifically in the organizer region of *Xenopus* gastrula embryos. *Genes Dev* 6, 356-366.
80. Taira, M., Otani, H., Jamrich, M., Dawid, I.B. (1994) : Expression of the LIM class homeobox gene *Xlim-1* in pronephros and CNS cell lineages of *Xenopus* embryos is affected by retinoic acid and exogastrulation. *Development* 120, 1525-1536.
81. Thomas, C.P., Erlandson, J.C., Edghill, E.L., Hattersley, A.T., Stolpen, A.H. (2008): A genetic syndrome of chronic renal failures with multiple renal cysts and early onset diabetes. *Kidney Int* 74, 1094-1099.
82. Thomas, H., Senkel, S., Erdmann, S., Arndt, T., Turan, G., Klein-Hitpass, L., Ryffel, G.U. (2004): Pattern of genes influenced by conditional expression of the transcription factors HNF6, HNF4 α and HNF1 β in a pancreatic β -cell line. *Nucleic Acids Res* 32, 1-12
83. Trainor, P.A., Krumlauf, R. (2001): Hox genes, neural crest cells and branchial arch patterning. *Curr Opin Cell Biol* 13: 698-705.
84. Ulinski, T., Lescure, S., Beaufils, S., Guigonis, V., Decramer, S., Morin, D., Clauin, S., Deschênes, G., Bouissou, F., Bensman, A., Bellanné-Chantelot, C. (2006) : Renal Phenotypes Related to Hepatocyte Nuclear Factor-1 β (TCF2) Mutations in a Pediatric Cohort. *J Am Soc Nephrol* 17, 497-503.
85. Verdeguer, F., Le Corre, S., Fischer, E., Callens, C., Garbay, S., Doyen, A., Igarashi, P., Terzi, F., Pontoglio, M. (2010): A mitotic transcriptional switch in polycystic kidney disease. *Nat Med* 16, 106-111.
86. Vize, P. D., Seufert, D. W., Carroll, T.J., Wallingford, J.B. (1997): Model Systems for the Study of Kidney Development: Use of the Pronephros in the Analysis of Organ Induction and Patterning. *Dev Biol* 188, 189-204.
87. Vize, P.D., Jones, E.A., Pfister, R. (1995): Development of the *Xenopus* Pronephric System. *Dev Biol* 171, 531-540.
88. Wallingford, J.B., Carroll, T.J., Vize, P.D. (1998): Precocious Expression of the Wilms' Tumor Gene *xWT1* Inhibits Embryonic Kidney Development in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 202, 103-112.

89. Weber, H., Holewa, B., Jones, E.A., Ryffel, G.U. (1996): Mesoderm and endoderm differentiation in animal cap explants: Identification of the HNF4-binding site as an activin A responsive element in the *Xenopus* HNF1 α promoter. *Development* 122, 1975-1984.
90. Welters, H.J., Senkel, S., Klein-Hitpass, L., Erdmann, S., Thomas, H., Harries, L.W., Pearson, E.R., Bingham, C., Hattersley, A.T., Ryffel, G.U., Morgan, N.G. (2006): Conditional expression of hepatocyte nuclear factor-1 β , the maturity-onset diabetes of the young-5 gene product, influences the variability and functional competence of pancreatic β -cells. *J Endocrinol* 190, 171-181.
91. Wiellette, E.L., Sive, H. (2003): *vhnf1* and *Fgf* signals synergize to specify rhombomere identity in the zebrafish hindbrain. *Development* 130, 3821-3829.
92. Wild, W., Pogge von Strandmann, E., Nastos, A., Senkel, S., Lingott-Frieg, A., Bulmann, M., Bingham, C., Ellard, S., Hattersley, A.T., Ryffel, G.U. (2000): The mutated human gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 β inhibits kidney formation in developing *Xenopus* embryos. *PNAS* 97, 4695-4700.
93. Wu, G., Bohn, S., Ryffel, G.U. (2004): The HNF1 β transcription factor has several domains, involved in nephrogenesis and partially rescues Pax8/*lim1*-induced kidney malformations. *Eur J Biochem* 271, 3715-3728.
94. Zernicka-Goetz, M., Pines, J., Ryan, K., Siemering, K.R., Haseloff, J., Evans, M.J., Gurdon, J.B. (1996): An indelible lineage marker for *Xenopus* using a mutated green fluorescent protein. *Development* 122, 3719-3724.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary DNA
cpm	counts per minute
DDT	1,3-Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAB	fragment antigen binding
GFP	green fluorescent protein
GRBB	gel retardation binding buffer
hCG	humans Choriongonadotropin
IgG	Immunglobulin G
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure
HNF	hepatocyte nuclear factor
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
luc	Luciferasegen
MEMFA	MOPS/EGTA/MgSO ₄ /(Para)Formaldehyd
mRNA	messenger RNA
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung der Transkriptionsfaktoren HNF1 α und HNF1 β
- Abb. 2: Anatomie des Pronephros von *Xenopus laevis*
- Abb. 3: Auswirkung der Frameshift-Mutation P328L329fsdelCCTCT auf die Struktur des HNF1 β -Proteins
- Abb. 4: In-vitro-Translation der HNF1 β -Mutante P328L329
- Abb. 5: Gelretardation-Analyse der HNF1 β -Mutante P328L329
- Abb. 6: Transaktivierungspotential der HNF1 β -Mutante P328L329 auf dem synthetischen Promotor (HP1)₄tk
- Abb. 7: Transaktivierungspotential der HNF1 β -Mutante P328L329 auf dem natürlichen Promotor Xalb(-662/+19)
- Abb. 8: Lokalisierung der HNF1 β -Mutante P328L329 in HeLa-Zellen durch Immunfluoreszenz
- Abb. 9: Kotransfektion der HNF1 β -Mutante P328L329 zur Analyse des Einflusses auf die Wildtypaktivität
- Abb. 10: Aktivierung des *Xenopus* HNF1 α -Promotors in transienten Transfektionen durch das humane HNF1 α und HNF1 β
- Abb. 11: Expression der humanen HNF1-Proteine im *Xenopus*-Embryo
- Abb. 12: Aktivierung des endogenen HNF1 α -Gens im *Xenopus*-Embryo durch das humane HNF1 α , HNF1 β und P328L329
- Abb. 13: *In vivo* Untersuchung des Pronephros in den Stadien 45 bis 48
- Abb. 14: Untersuchung des Pronephros in den Stadien 45 bis 48 mittels Immunfluoreszenz
- Abb. 15: Untersuchung des Pronephros in den Stadien 35/36, 37/38 und 39 mittels Immunfluoreszenz
- Abb. 16: Untersuchung der Xlim-1 Expression mittels In-situ-Hybridisierung an ganzen Embryonen
- Abb. 17: Alleinige Fehlbildung des Pronephros
- Abb. 18: Phänotypische Veränderungen des Pigmentierungsmusters
- Abb. 19: Phänotypische Veränderungen des Kopfskeletts und des Auges
- Abb. 20: Phänotypische Veränderung der Ohrkapsel
- Tab. 1: In-vivo-Quantifizierung der phänotypischen Veränderungen des Pronephros in *Xenopus*-Larven der Stadien 45-48
- Tab. 2: Phänotypische Veränderungen der Pigmentierung
- Tab. 3: Phänotypische Veränderungen des Kopfes

Abbildungen und Tabellen

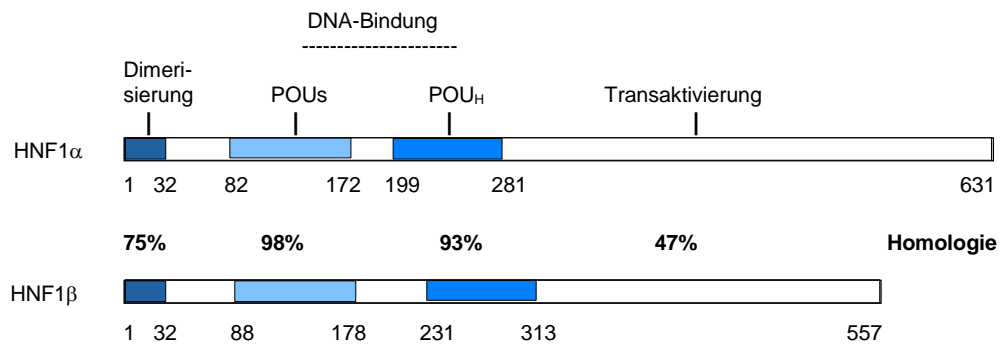


Abb. 1: Schematische Darstellung der Transkriptionsfaktoren HNF1 α und HNF1 β . Die funktionellen Domänen und ihre Aminosäurepositionen sind angegeben. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Homologie zwischen dem HNF1 α - und HNF1 β -Protein. Modifiziert entnommen aus Bach und Yaniv (1993) und Cereghini et al. (1996). POU_s: POU-spezifische Domäne; POU_H: POU-Homeodomäne.

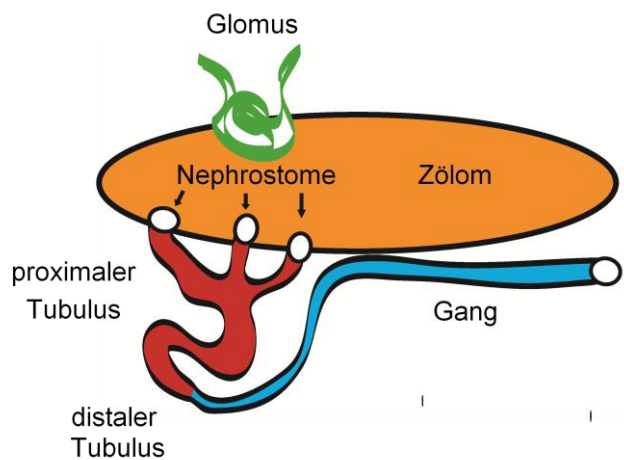


Abb. 2: Anatomie des Pronephros von *Xenopus laevis*. Die Grundstruktur ist schematisch dargestellt. Glomus (grün), Tubulus (rot) und Gang (blau) sind eingezeichnet. Leicht modifiziert übernommen aus Ryffel (2003).

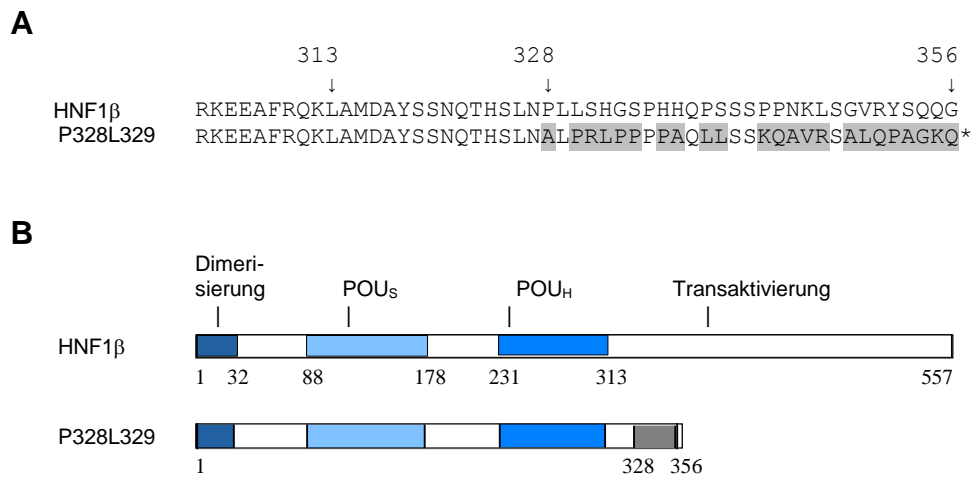


Abb. 3: Auswirkung der Frameshift-Mutation P328L329fsdelCCTCT auf die Struktur des HNF1β-Proteins. (A) Die von der Mutation betroffene Aminosäureregion des HNF1β-Proteins ist im Ein-Buchstabencode dargestellt. Die obere Reihe zeigt die Wildtypsequenz (HNF1β), die untere Reihe die mutierte Sequenz (P328L329). Von der Wildtypsequenz abweichende Aminosäuren sind grau hinterlegt. Der Stern markiert den Abbruch der Translation durch Ausbildung eines vorzeitigen Stop-Codons. **(B)** Schematische Darstellung des HNF1β-Wildtypproteins und der HNF1β-Mutante P328L329. Die funktionellen Domänen und ihre Aminosäurepositionen sind angegeben (nach Bach und Yaniv, 1993). Der mutierte Bereich ist grau schattiert.

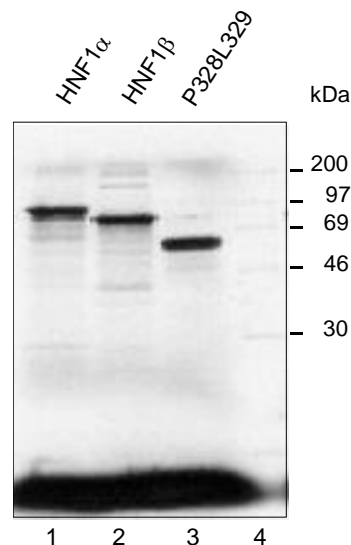


Abb. 4: In-vitro-Translation der HNF1β-Mutante P328L329. Reticulocytenlysat wurde nach *in vitro* Transkription und Translation des Myc-markierten HNF1β (Spur 1), HNF1β (Spur 2) und P328L329 (Spur 3) in einem Protein-Gel analysiert. Die In-vitro-Translation erfolgte in Gegenwart von ³⁵S-Methionin, so dass die HNF1-Proteine autoradiografisch nachgewiesen werden konnten. In Spur 4 wurde ein Gemisch verschiedener ¹⁴C-methylierter Markerproteine aufgetragen.

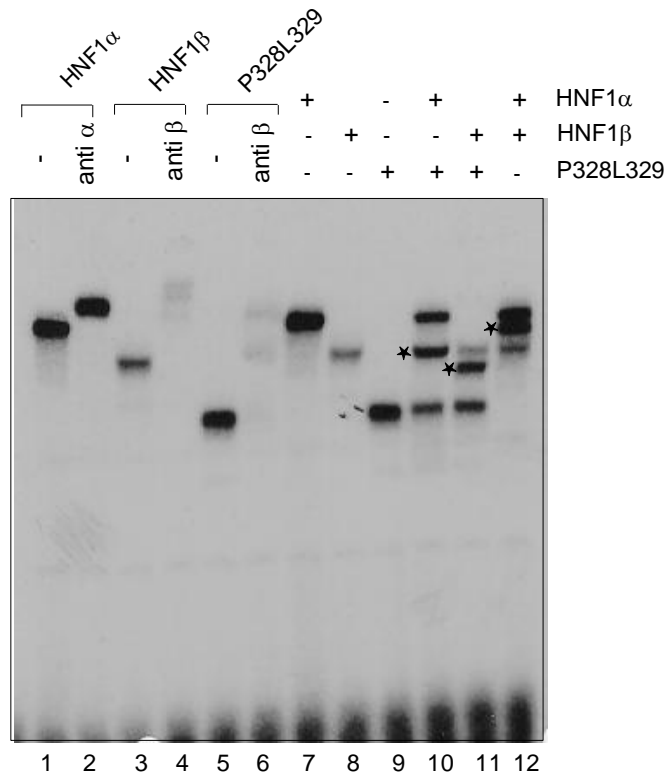
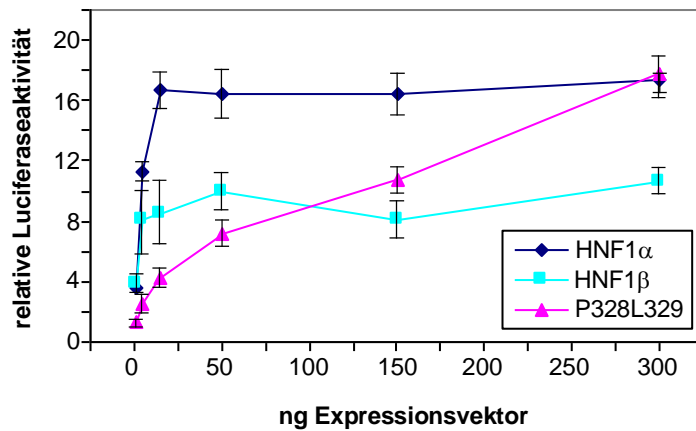


Abb. 5: Gelretardations-Analyse der HNF1 β -Mutante P328L329. Die *in vitro* translatierten Myc-markierten HNF1-Proteine wurden einzeln oder paarweise mit dem radioaktiv markierten HP1-Oligonukleotid, das eine HNF1-Bindestelle enthält, inkubiert. Die Bindung der Proteine an das HP1-Oligonukleotid zeigt sich an der geringeren Mobilität im Vergleich zum freien Oligonukleotid (unterer Rand des Gels). Die Spezifizierung der Protein-DNA-Komplexe erfolgte mit dem monoklonalen HNF1 α -spezifischen Antikörper RAD1 (anti α ; Bartkowsky et al., 1993) oder einem HNF1 β -spezifischen Antiserum, das gegen das Volllängen-Protein gerichtet ist (anti β ; Lemm et al., 1999). Die Zugabe der verschiedenen In-vitro-Translationsprodukte und Antikörper ist angegeben. Heterodimere sind mit einem Stern markiert.

A



B

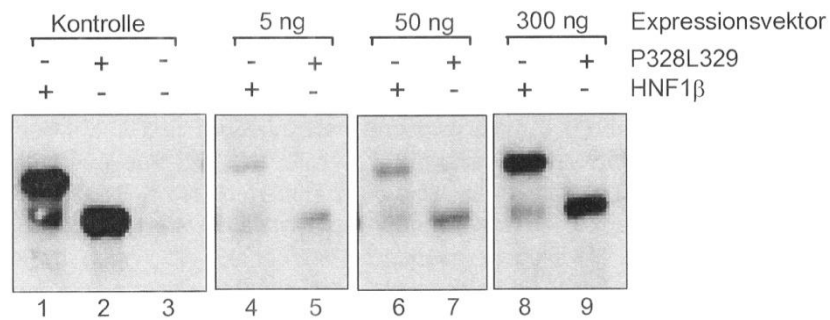


Abb. 6: Transaktivierungspotential der HNF1 β -Mutante P328L329 auf dem synthetischen Promotor (HP1)4tk. (A) HeLa-Zellen wurden mit steigenden Mengen (1,5, 5, 15, 50, 150 und 300 ng) der Expressionsvektoren für das Myc-markierte HNF1 β , P328L329 und HNF1 α , sowie in allen Ansätzen mit 1,3 μ g des Reportergenkonstrukts (HP1)4tk-luc transfiziert. Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität. Referenzwert hierfür war die Aktivität nach Transfektion des Expressionsvektors ohne einklonierter cDNA. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von jeweils sechs unabhängigen Messwerten an. **(B)** Gesamtzellextrakte aus transfizierten HeLa-Zellen wurden in einem Western-Blot analysiert. Die Extrakte stammen aus den oben aufgeführten Transfektionsexperimenten. Als Kontrolle diente Gesamtzellextrakt aus nicht transfizierten HeLa-Zellen (Spur 3) sowie im Reticulocytenslysat translatiertes HNF1 β (Spur 1) und P328L329 (Spur 2). Die transfizierten Expressionsvektoren und Mengen sind angegeben. Der Nachweis der HNF1 β -Proteine erfolgte mit einem gegen das Myc-Epitop gerichteten Antikörper (9E10).

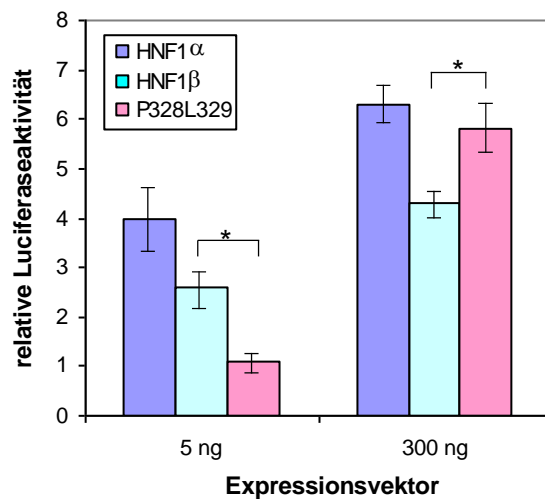


Abb. 7: Transaktivierungspotential der HNF1 β -Mutante P328L329 auf dem natürlichen Promotor Xalb (-662/+19). HeLa-Zellen wurden mit 5 oder 300 ng der Expressionsvektoren für das Myc-markierte HNF1 α , HNF1 β und P328L329, sowie in allen Ansätzen mit 1,3 μ g des Reportergenkonstrukts Xalb(-662/+19)luc transfiziert. Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität. Referenzwert hierfür war die Aktivität nach Transfektion des Expressionsvektors ohne einklonierter cDNA. Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität. Referenzwert hierfür war die Aktivität nach Transfektion des Expressionsvektors ohne einklonierter cDNA. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von jeweils sechs unabhängigen Messwerten an. Die statistische Auswertung zeigte, dass der Unterschied zwischen dem Transaktivierungspotential des Wildtyps und der Mutante jeweils signifikant ist (*: $p=0,01$).

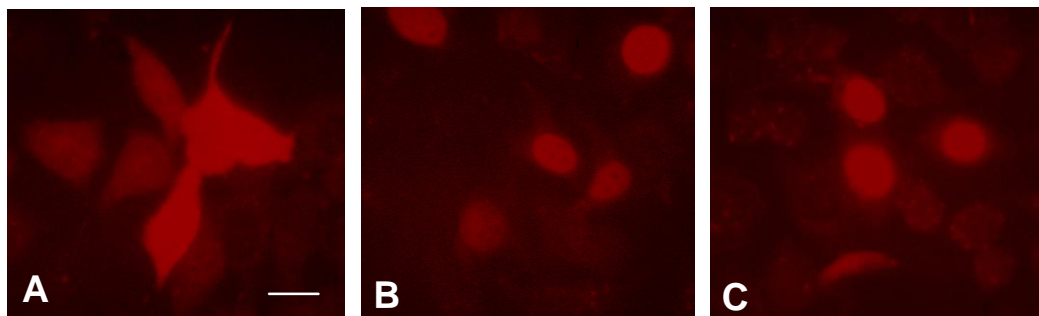


Abb. 8: Lokalisierung der HNF1 β -Mutante P328L329 in HeLa-Zellen durch Immunfluoreszenz. HeLa-Zellen wurden mit 300 ng der Expressionsvektor für das Myc-markierte HNF1 α (A), HNF1 β (B) oder P328L329 (C) transfiziert. Die Analyse erfolgte mit einem gegen das Myc-Epitop gerichteten Antikörper (9E10), dessen Bindung wurde durch einen rotfluoreszierenden sekundären Antikörper sichtbar gemacht. Der Balken entspricht 10 μ m.

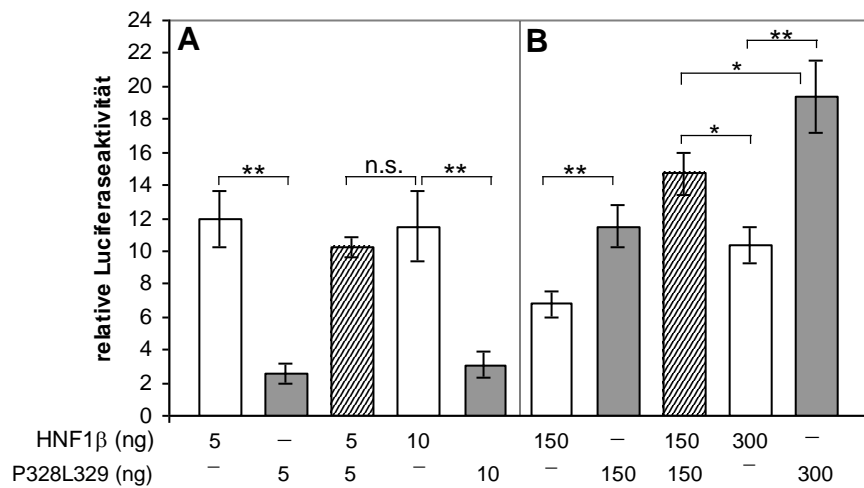


Abb. 9: Kotransfektion der HNF1β-Mutante P328L329 zur Analyse des Einflusses auf die Wildtypaktivität. HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen der Expressionsvektoren für das Myc-markierte HNF1β und P328L329, sowie in allen Ansätzen mit 1,3 µg des Reportergenkonstrukts (HP1)4tk-luc transfiziert. Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität. Referenzwert hierfür war die Aktivität nach Transfektion des Expressionsvektors ohne einklonierter cDNA. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von jeweils sechs unabhängigen Messwerten an. Signifikante Unterschiede der Transaktivierungspotentiale: * $p < 0,05$ und ** $p < 0,005$. Unterschied der Transaktivierungspotentiale nicht signifikant: (n.s.).

A



B

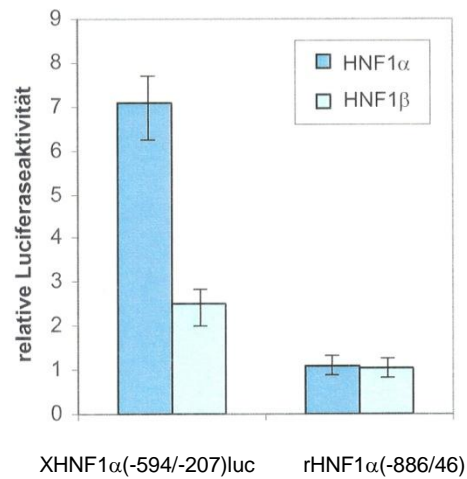


Abb. 10: Aktivierung des *Xenopus* HNF1 α -Promotors in transienten Transfektionen durch das humane HNF1 α und HNF1 β . (A) Schematische Darstellung der HNF1 α -Promotorregion -594 bis -207 aus *Xenopus*. Die Bindestellen für Transkriptionsfaktoren und ihre Sequenzpositionen sind angegeben. Darunter die beiden Bindestellen für die HNF1-Proteine. (B) Transiente Transfektionen in HeLa-Zellen. 1,3 μ g des Reportergenkonstrukts XHNF1 α (-594/-207)luc wurde mit 300 ng des Expressionsvektors für das Myc-markierte HNF1 α oder HNF1 β transfiziert. Zur Kontrolle der Spezifität wurden entsprechende Transfektionen mit dem HNF1 α -Promotor aus der Ratte (rHNF1 α (-886/-46)luc) durchgeführt, der keine HNF1-Bindestellen enthält. Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität. Referenzwert hierfür war die Aktivität nach Transfektion des Expressionsvektors ohne einklonierter cDNA. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von jeweils sechs unabhängigen Messwerten an.

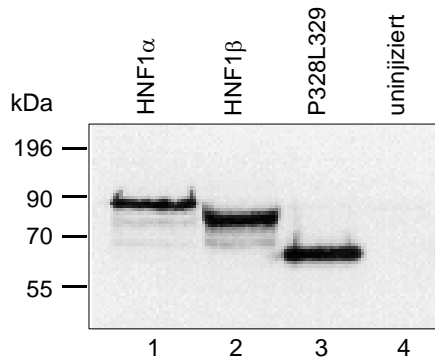


Abb. 11: Expression der humanen HNF1-Proteine im *Xenopus*-Embryo. Western-Blot-Analyse von Extrakten aus injizierten Embryonen des Stadiums 12,5 (spätes Gastrulastadium) mit dem Myc-spezifischen Antikörper 9E10. Es wurde jeweils Extrakt von zwei Embryonen analysiert. Spur 4 enthält Extrakt von zwei nicht injizierten Embryonen desselben Stadiums. Molekulargewichte von Markerproteinen sind angegeben.

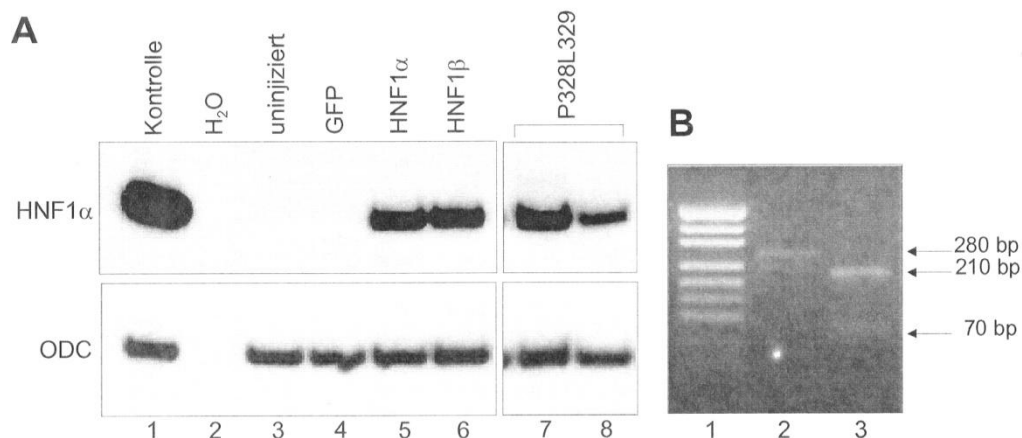


Abb. 12: Aktivierung des endogenen HNF1 α -Gens im *Xenopus*-Embryo durch das humane HNF1 α , HNF1 β und P328L329. (A) RT-PCR zum Nachweis der endogenen HNF1 α -Aktivierung. Befruchtete *Xenopus*-Eier wurden mit 0,25 ng GFP-mRNA alleine (Spur 4) oder zusammen mit 1 ng der mRNA für das Myc-markierte HNF1 α , HNF1 β oder P328L329 injiziert (Spuren 5-8). Im späten Gastrulastadium (Stadium 12,5) wurde RNA aus den Embryonen isoliert und mittels RT-PCR die Expression des HNF1 α - und des Haushaltsgens Ornithin-Decarboxylase (ODC) untersucht. Als Kontrollen dienten in der RT-PCR RNA aus nicht injizierten Larven des Stadiums 20 (Spur 1) und 12,5 (Spur 3) oder keine RNA (Spur 2). Die PCR-Produkte wurden in einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel ausgewertet. **(B)** *AccI*-Restriktion zur Unterscheidung zwischen dem injizierten humanen und dem endogenen *Xenopus* HNF1 α . Die Auswertung erfolgte in einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel. Das unbehandelte PCR-Produkt hat wie erwartet eine Größe von 280 bp (Spur 2). Die *AccI*-Restriktion des 280-bp-Fragments führt zu zwei spezifischen Fragmenten von 210 und 70 bp (Spur 3).

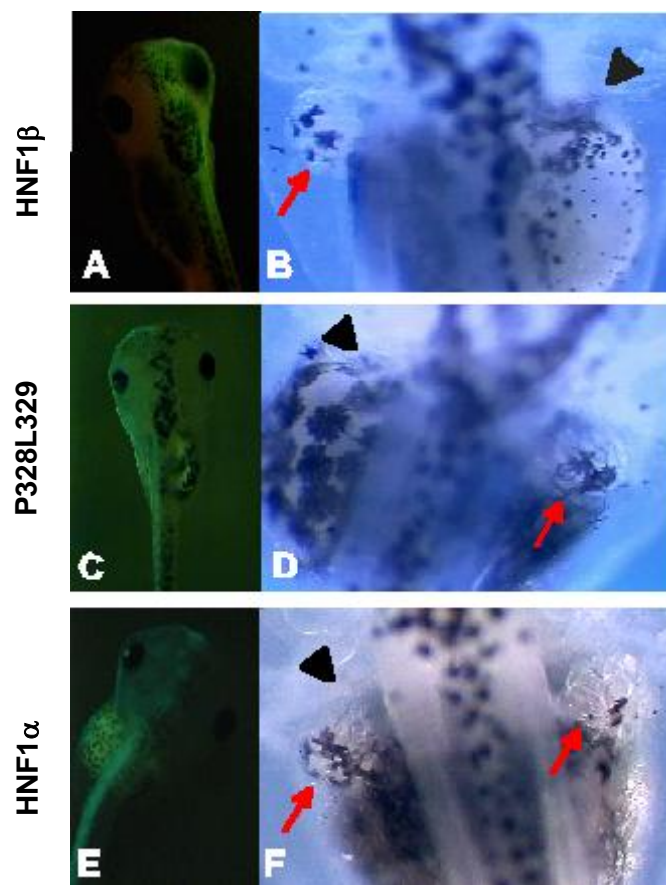


Abb. 13: In-vivo-Untersuchung des Pronephros in den Stadien 45 bis 48. (A-F) Zweizellembryonen wurden unilateral mit 0,25 ng GFP-mRNA und 1 ng mRNA, die für das Myc-markierte HNF1 β (A und B), P328L329 (C und D) und HNF1 α (E und F), koinjiziert. (A, C, E) Larven, die das *green fluorescent protein* (GFP) auf der rechten oder linken Seite exprimieren. (B, D, F) Dieselben Larven wurden hinsichtlich der Entwicklung des Pronephros bei einer stärkeren Vergrößerung analysiert. Die injizierte Seite ist mit einer schwarzen Pfeilspitze markiert, das Tubulknäuel des Pronephros mit einem roten Pfeil. (B, D) Auf der injizierten Seite fehlt das Tubulknäuel. (F) Das Tubulknäuel der injizierten Seite zeigt keine morphologischen Auffälligkeiten.

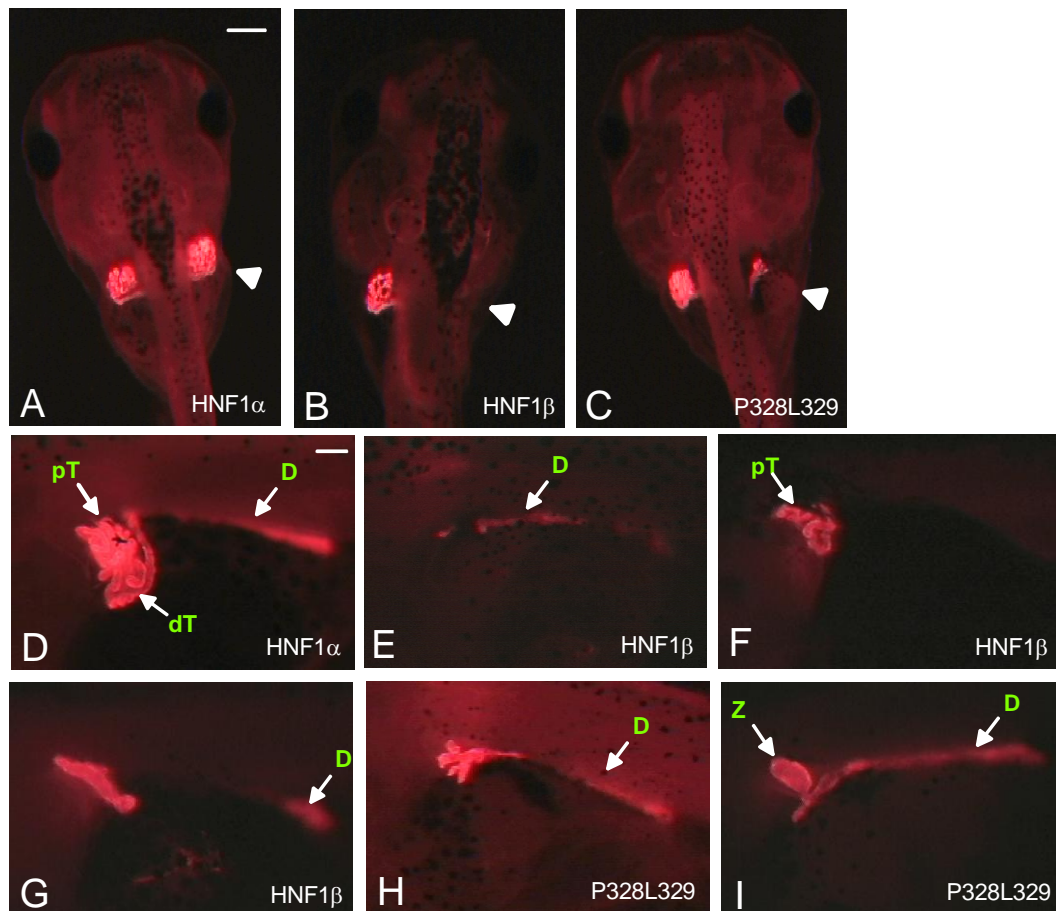


Abb. 14: Untersuchung des Pronephros in den Stadien 45 bis 48 mittels Immunfluoreszenz. In ganzen Larven wurde der Pronephros mit den Antikörpern 3G8 und 4A6, die terminale Differenzierungsmarker der Tubuli und des Gangs erkennen, und einem sekundären rotfluoreszierenden Antikörper sichtbar gemacht. (A-I) Verschiedene Larven, die als Zweizellembryo unilateral mit 0,25 ng GFP-mRNA und 1 ng der angegebenen HNF1-mRNA injiziert wurden. (A-C) Dorsale Ansichten. Die injizierte Seite ist mit einer weißen Pfeilspitze markiert. Der Balken entspricht 300 μm . (D-I) Laterale Ansichten des Pronephros. Es sind ausschließlich die Pronephroi der injizierten Seiten zu sehen. Der Balken entspricht 200 μm . Zur besseren Übersicht wurden einige Larven gespiegelt, so dass anterior links und posterior rechts ist. pT: proximaler Tubulus; dT: distaler Tubulus; D: Ductus; Z: zystenähnliche Struktur

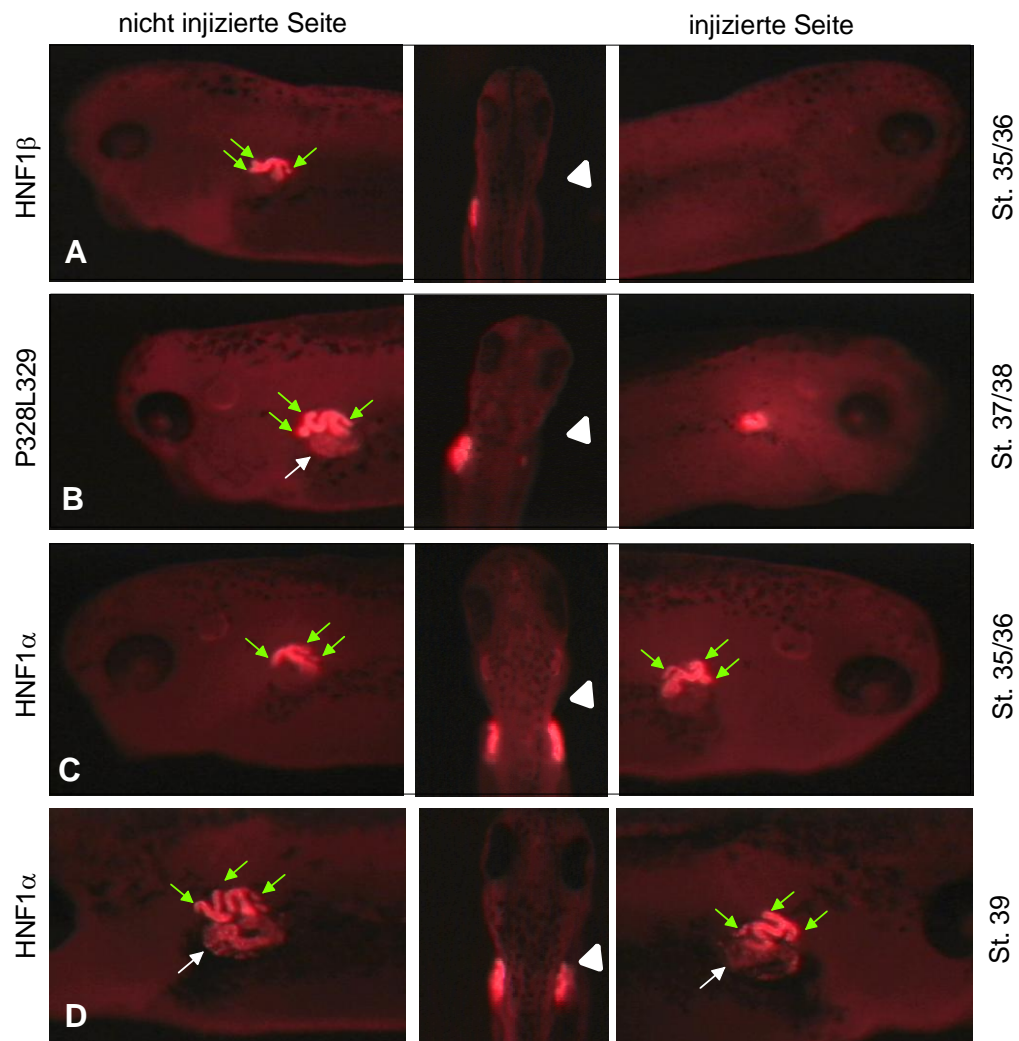


Abb. 15: Untersuchung des Pronephros in den Stadien 35/36, 37/38 und 39 mittels Immunfluoreszenz. Der Pronephros wurde in ganzen Larven mit den Erstantikörpern 3G8 und 4A6 und einem rotfluoreszierenden sekundären Antikörper sichtbar gemacht. Gezeigt werden Larven der Stadien 35/36, 37/38 und 39, die als Zweizellembryo unilateral mit 0,25 ng GFP-mRNA und 1 ng der angegebenen HNF1-mRNA injiziert wurden. Von jeder Larve sind die nicht injizierte und injizierte Seite in lateraler Ansicht sowie eine dorsale Ansicht zu sehen. In der dorsalen Ansicht ist die injizierte Seite mit einer weißen Pfeilspitze markiert. In der lateralen Ansicht weisen grüne Pfeile auf die drei Äste des proximalen Tubulus, der weiße Pfeil auf den gewundenen Abschnitt des distalen Tubulus.

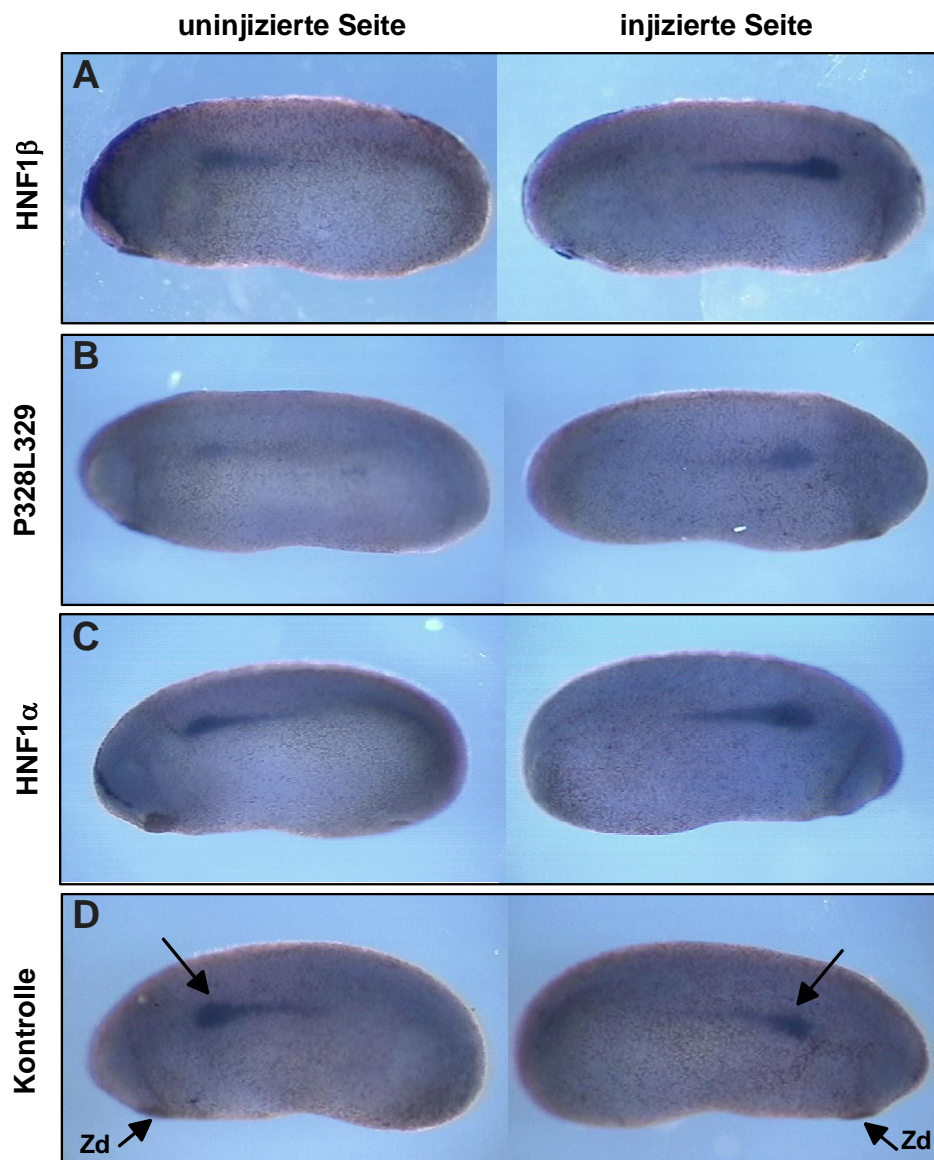


Abb. 16: Untersuchung der Xlim-1-Expression mittels In-situ-Hybridisierung an ganzen Embryonen.

Die Xlim-1-Expression wurde in Schwanzknospenembryonen des Stadiums 20 mit einer digoxigenin-markierten Xlim-1-Sonde und einem enzymgekoppelten Digoxigenin-Antikörper detektiert. (A-C) Embryonen, die im Zweizellstadium mit 0,25 ng GFP-mRNA und 1 ng der angegebenen HNF1-mRNA injiziert wurden. Es wird jeweils die nicht injizierte und injizierte Seite eines Embryos gezeigt. (D) Nicht injizierter Kontrollembryo. Die Zementdrüse (Zd) gibt die Kopfregion des Embryos zu erkennen, der Pfeil weist auf die spezifische Xlim-1-Färbung. Die Untersuchung umfasste 8 HNF1 α -, 9 HNF1 β - und 4 P328L329-injizierte Embryonen aus jeweils 2 unabhängigen Injektionsexperimenten, sowie 10 nicht injizierte Kontrollembryonen.

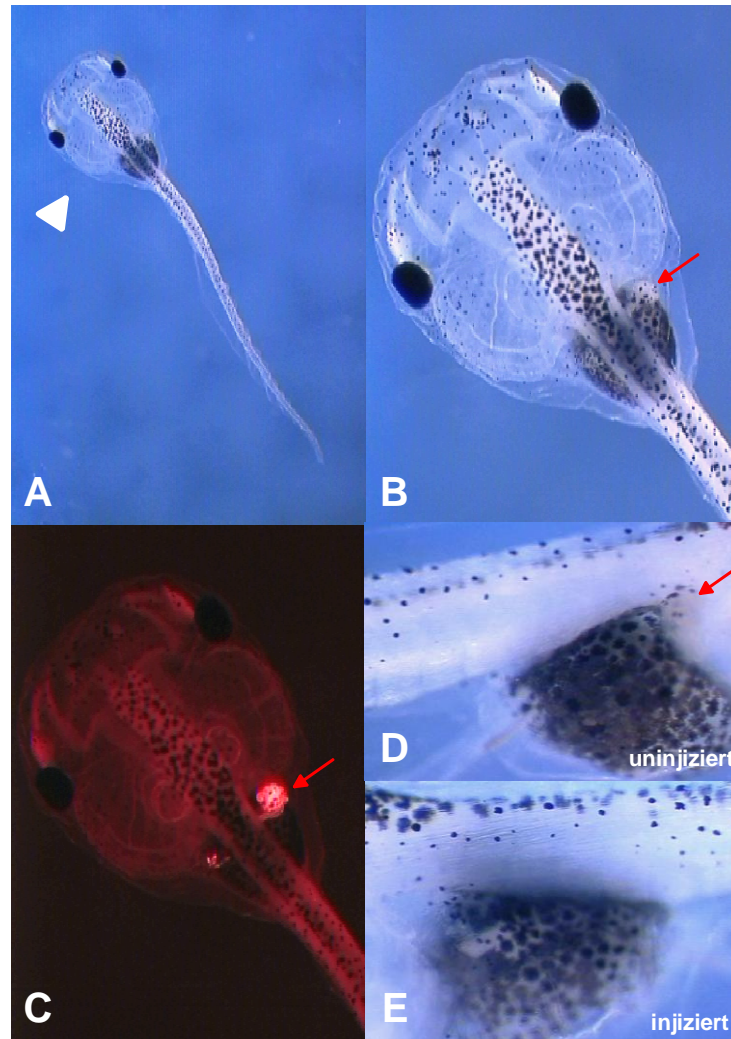


Abb. 17: Alleinige Fehlbildung des Pronephros. (A-E) *Xenopus*-Larve des Stadiums 46, die als Zweizellembryo unilateral mit 0,25 ng GFP- und 1 ng P328L329-mRNA injiziert wurde. Visualisierung des Pronephros mittels Immunfluoreszenz wie in Abb. 14 und 15 beschrieben. (A) Die Übersichtsaufnahme zeigt eine morphologisch normal entwickelte Larve (dorsale Ansicht). (B) Eine vergrößerte Ansicht zeigt, dass auf der rechten, injizierten Seite die Pronephros-Tubuli stark reduziert sind, andere Fehlbildungen sind jedoch nicht zu erkennen. (C) Die Fluoreszenzanalyse bestätigt die in (B) festgestellte Fehlbildung des Pronephros. (D, E) Die injizierte Seite zeigt auch keine Auffälligkeiten in der Pigmentierung (laterale Ansichten). Die weiße Pfeilspitze weist auf die injizierte Seite, der rote Pfeil auf den Pronephros.

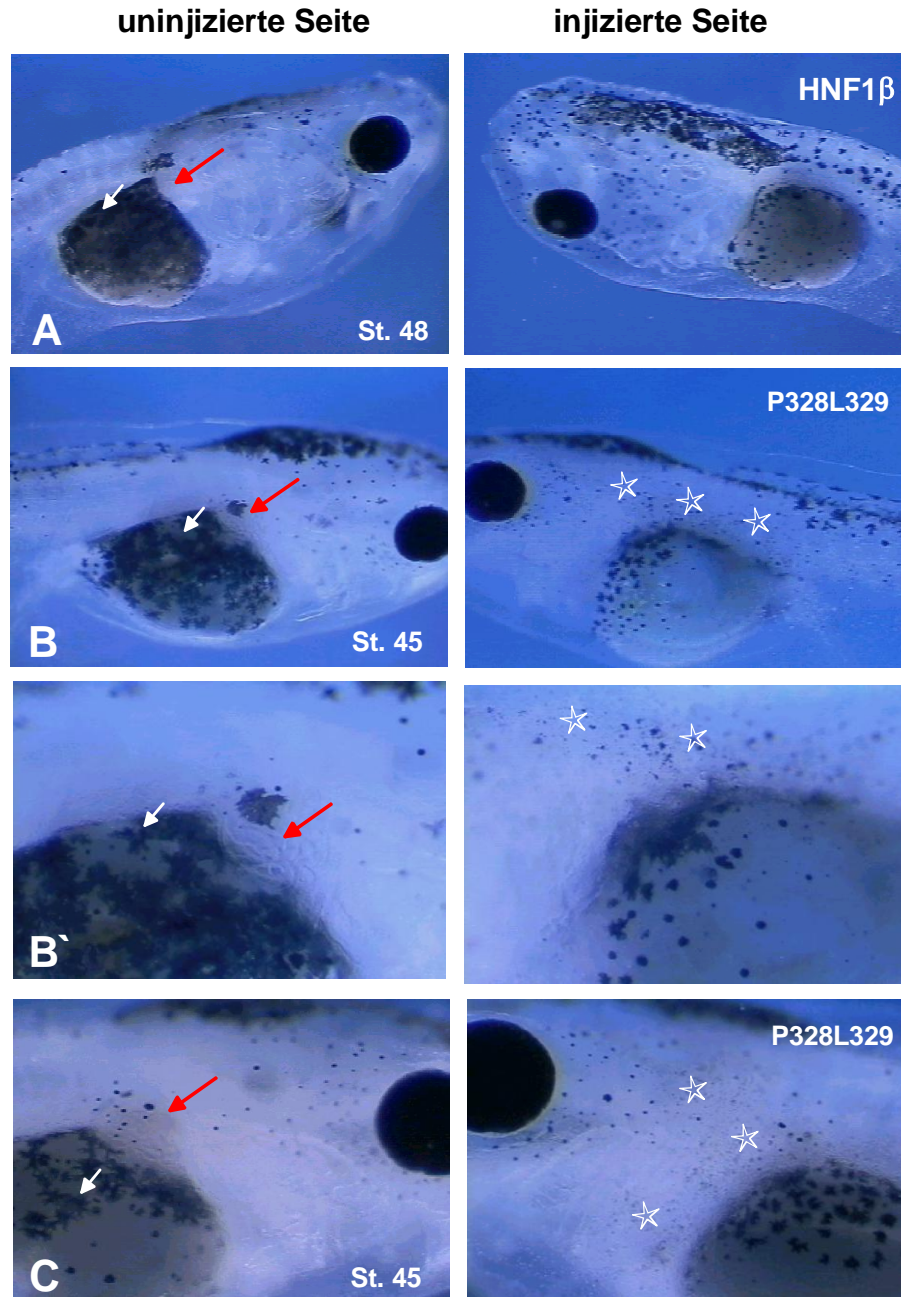


Abb. 18: Phänotypische Veränderungen des Pigmentierungsmusters. Gezeigt werden Larven in den Stadien 45 und 48, die als Zweizellembryonen mit 0,25 ng GFP-mRNA und 1 ng der angegebenen HNF1-mRNA injiziert wurden. Dargestellt ist jeweils die nicht injizierte und injizierte Seite einer Larve in Lateralansicht. (A) HNF1 β -injizierte Larve mit reduzierter Anzahl an Melanozyten im Peritoneum. (B) P328L329-injizierte Larve mit ectopischer Pigmentierung im Gewebe nahe dem Pronephros und in der ventralen Kante der Axialmuskulatur. Zusätzlich ist die Anzahl der Melanozyten im Peritoneum reduziert. (B') Vergrößerte Ansicht der betroffenen Region der in (B) abgebildeten Larve. (C) P328L329-injizierte Larve mit ectopischer Pigmentierung im Gewebe nahe dem Pronephros und in der posterioren Kiemenregion. Sternförmige Melanozyten sind mit einem weißen Pfeil, ectopisches Pigment mit einem weißen Stern, der Pronephros mit einem roten Pfeil markiert.

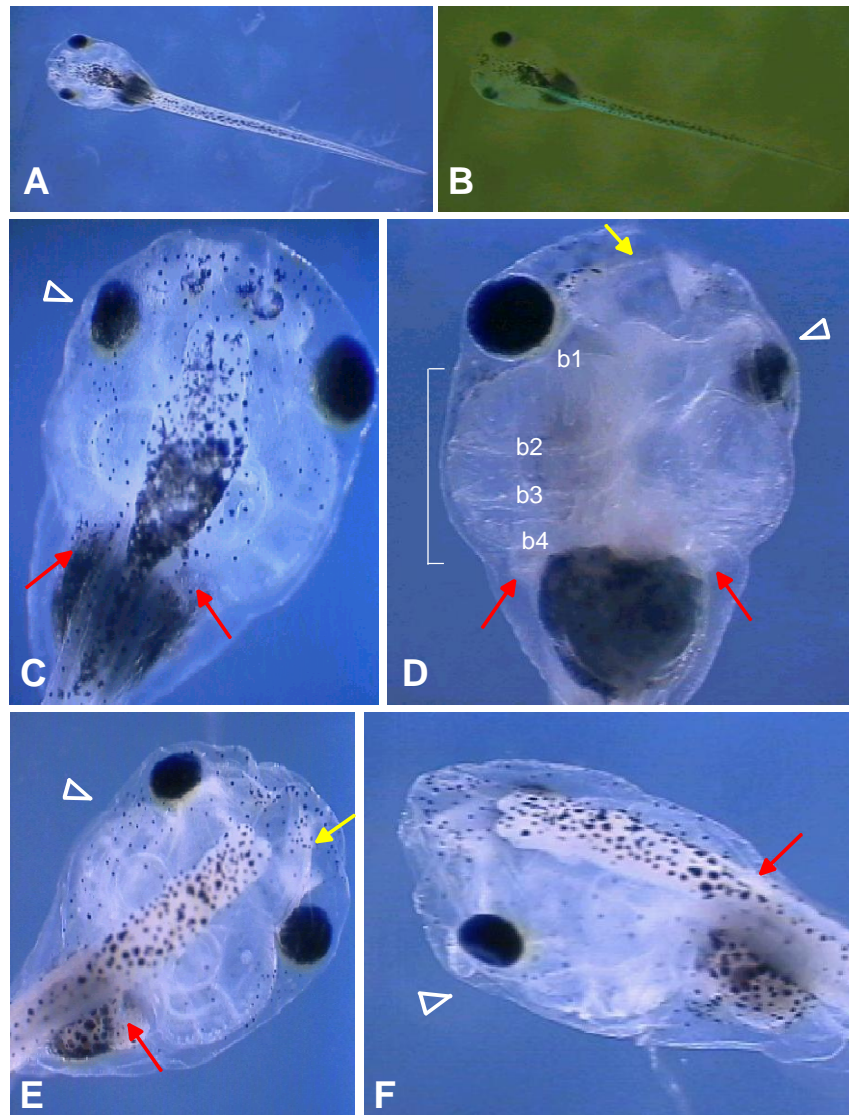


Abb. 19: Phänotypische Veränderungen des Kopfskeletts und des Auges. (A-D) HNF1 β -injizierte Larve des Stadiums 45. (A, B) Übersichtsaufnahmen (dorsale Ansichten). Die linke, injizierte Seite zeigt eine vollständige halbseitige GFP-Fluoreszenz. (C) Vergrößerte dorsale Ansicht. Die Kopfregion der injizierten Seite ist fehlgebildet. (D) Ventrale Ansicht. Auf der injizierten Seite ist die Kiemenregion disorganisiert. Der Meckel'sche Knorpel fehlt oder ist fehlgebildet. Auf der nicht injizierten Seite ist die Kiemenregion durch eine Klammer gekennzeichnet, die 4 Branchialbögen (b1-b4) sind angegeben. Der gelbe Pfeil markiert den Meckel'schen Knorpel. (E, F) P328L329-injizierte Larve des Stadiums 46. (E) Dorsale Ansicht. Die Kopfregion der linken, injizierten Seite ist fehlgebildet. Der Meckel'sche Knorpel ist auf der Kontrollseite mit einem gelben Pfeil markiert. (F) Dorsolaterale Ansicht. Auf der injizierten Seite ist eine starke Reduktion verschiedener Elemente des anterioren Kopfskeletts zu erkennen aus dem der Kieferapparat hervorgeht. Beide Larven haben zudem auf der injizierten Seite ein kleineres Auge. Die injizierte Seite ist mit einer weißen Pfeilspitze markiert.

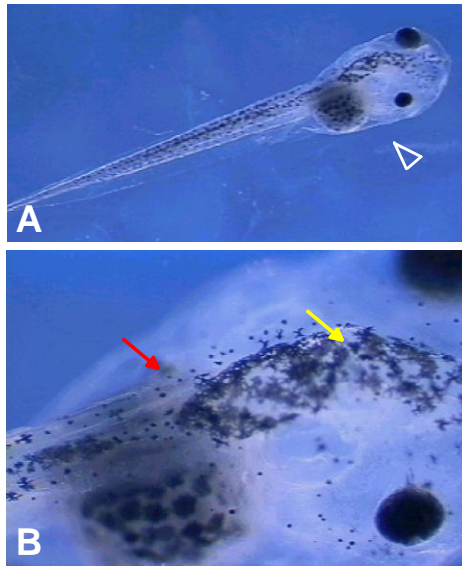


Abb. 20: Phänotypische Veränderung des Gehirns. Gezeigt wird eine P328L329-injizierte Larve des Stadiums 45. (A) Dorsolaterale Übersichtsaufnahme. Das Gehirn weist eine starke Wölbung auf. Auf der rechten, injizierten Seite sind zudem die Kopfregion und das Auge kleiner. (B) Vergrößerte Ansicht der in (A) gezeigten Larve. Der gelbe Pfeil kennzeichnet die Wölbung des Gehirns, der rote Pfeil den Pronephros, die weiße Pfeilspitze die injizierte Seite.

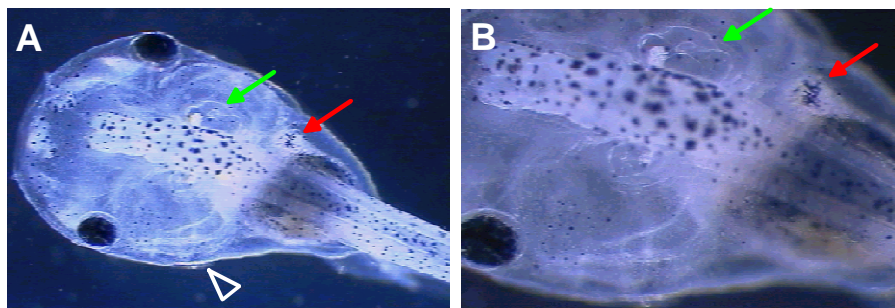


Abb. 21: Phänotypische Veränderung der Ohrkapsel. (A, B) Gezeigt wird eine P328L329-injizierte Larve des Stadiums 48. Die linke, injizierte Seite weist eine reduzierte Ohrkapsel auf. Außerdem ist auf der injizierten Seite der Pronephros reduziert und das Auge kleiner. Auf der nicht injizierten Seite ist die Ohrkapsel mit einem grünen Pfeil, der Pronephros mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

Tab. 1: In-vivo-Quantifizierung der phänotypischen Veränderungen des Pronephros in *Xenopus*-Larven der Stadien 45-48

Injizierte mRNA	N	Entwicklung der Pronephros-Tubuli		
		Normal (%)	Reduziert (%)	Fehlt (%)
HNF1 β	122	51	27	22
P328L329	58	4	38	58
HNF1 α	122	100	0	0

N: Gesamtzahl der analysierten Larven, die als Zweizellembryo unilateral mit 0,25 ng GFP-mRNA sowie 1 ng der angegebenen HNF1-mRNA koinjiziert wurden. In die Untersuchung wurden auch Larven mit einbezogen, die eine leichte asymmetrische Kopfentwicklung, ein kleineres Auge und Pigmentierungsanomalien auf der injizierten Seite aufwiesen. Normal: normal großes Tubulknäuel; reduziert: Tubulknäuel um mindestens ein $\frac{1}{4}$ reduziert; fehlt: keine Tubuli vorhanden.

Tab. 2: Phänotypische Veränderungen der Pigmentierung

Injizierte mRNA	N	Ektopisch (%)	Reduziert (%)
HNF1 β	40	0	8
P328L329	44	39	50
HNF1 α	51	0	0

N: Gesamtzahl der analysierten Larven, die als Zweizellembryo unilateral mit 0,25 ng GFP-mRNA sowie 1 ng der angegebenen HNF1-mRNA koinjiziert wurden.

Tab. 3: Phänotypische Veränderungen des Kopfes

Injizierte mRNA	N	Kopfskelett (%)	Auge (%)	Gehirn (%)
HNF1 β	40	70	28	23
P328L329	44	43	34	5
HNF1 α	51	0	0	0

N: Gesamtzahl der analysierten Larven, die als Zweizellembryo unilateral mit 0,25 ng GFP-mRNA sowie 1 ng der angegebenen HNF1-mRNA koinjiziert wurden. Die Beurteilung der Entwicklung erfolgte in den Stadien 45 bis 48. Auswahlkriterium war eine unilaterale GFP-Fluoreszenz. Der branchiale und craniofaciale Phänotyp sind zum Kopfskelett-Phänotyp zusammengefasst.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit basiert auf Untersuchungen, die ich im Labor von Prof. Dr. G. U. Ryffel am Institut für Zellbiologie der Universität-Gesamthochschule Essen durchgeführt habe.

Herr Prof. Dr. Ryffel hat mir durch die Aufnahme in sein Team die Beteiligung an einem sehr interessanten Projekt ermöglicht. Ich bedanke mich bei ihm für die Begleitung meiner Arbeit und die stets konstruktiven Diskussionen. Besonders dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. Ryffel für die ermutigende Unterstützung, durch die ich meine 1999 begonnene Dissertation nach einer zehnjährigen Familienphase unter Berücksichtigung der neueren Forschungsergebnisse fertig stellen konnte. Ohne seine erneute Bereitschaft zur Begleitung meiner Arbeit und Diskussion meiner Ergebnisse hätte ich die nun vorliegende Dissertation nicht erstellen können.

Gerne erinnere mich zurück an die gute Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe im Labor. Besondern Dank gebührt Sabine Senkel, Dagmar Werdien, Gudrun Peiler, Michael Borgschulze und Dr. Heike Thomas, die mich im Labor zuverlässig und tatkräftig unterstützt haben.

Des Weiteren gilt mein Dank Carola Seifert und Margret Hansen für anregende Gespräche und das Gegenlesen der Texte, sowie meinen beiden Töchtern Ricarda und Isabella für ihre Ermutigungen und ihr Verständnis.

Bedanken möchte ich mich auch bei Anne und Andreas Braun für ihre moralische und freundschaftliche Unterstützung in der Endphase.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.